



*Ministero dell'Istruzione,  
dell'Università e della Ricerca*



*Università degli Studi di Palermo*

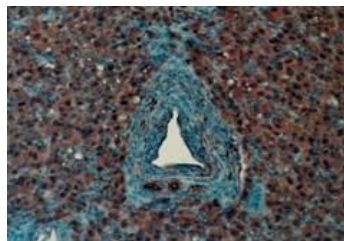
## **Dottorato di Ricerca in Immunofarmacologia**

### **XXII ciclo**

MED-04

***La neutralizzazione dell'IL4 induce il differenziamento e la  
sensibilizzazione alle terapie convenzionali delle cellule  
staminali di mammella***

**Coordinatore  
Chia.mo Prof. F. Dieli**



**Tutor  
Prof. Giorgio Stassi**

**Candidato  
Dott. ssa Marisa Spina**

2007/2010



*Ministero dell'Istruzione,  
dell'Università e della Ricerca*



*Università degli Studi di Palermo*

## **Dottorato di Ricerca in Immunofarmacologia**

### **XXII ciclo**

MED-04

***La neutralizzazione dell'IL4 induce il differenziamento e la sensibilizzazione alle terapie convenzionali delle cellule staminali di mammella***

**Coordinatore**

**Chia.mo Prof. F. Dieli**

**Tutor**

**Prof. Giorgio Stassi**

**Candidato**

**Dott. ssa Marisa Spina**

2007/2010

# **INDICE**

## **INTRODUZIONE**

### **Tumore alla mammella**

**Incidenza e istotipi.....pag. 4**

**Malattia delle cellule staminali.....pag. 6**

**Cellule staminali: definizione, classificazione e ruoli.....pag. 7**

**Modello dell'evoluzione clonale contro l'ipotesi delle CST.. pag. 10**

**Identificazione e isolamento delle SC.....pag. 11**

**CST e metastasi.....pag 13**

**Caratterizzazione molecolare e fenotipica dei sottotipi di cancro alla mammella .....pag.16**

**CST: promettente bersaglio della terapia anticancro.....pag 21**

# **RISULTATI**

**Caratterizzazione molecolare e fenotipica di carcinomi mammari.....pag 27**

**L'inibizione dell'IL4 amplifica la risposta tumorale alla morte indotta dal chemioterapico *in vitro* .....pag 29**

**Sfere di mammella mantengono il potenziale tumorigenico *in vivo* .....pag. 32**

**IL4DM induce al differenziamento e sensibilizza alle terapie convenzionali ..... pag. 33**

**BMP4 ipoteticamente media il processo differenziativo attuato dall'IL4DM *in vivo* ..... pag. 37**

**L'IL4 in CST di mammella agisce da fattore di sopravvivenza e contribuisce al mantenimento della staminalità..... pag.41**

**Discussione..... pag.44**

**Materiali e metodi.....pag.47**

**Bibliografia..... pag.54**

# **INTRODUZIONE**

## **Tumore alla mammella**

### **Incidenza e istotipi**

Il carcinoma della mammella è il tumore più frequente della popolazione femminile e rappresenta la seconda causa di morte, dopo le malattie cardiovascolari, nelle donne tra i 35 e i 75 anni. Si stima che circa 1 donna su 12 durante l'arco della propria vita potrebbe essere affetta da tale patologia. Risulta abbastanza infrequente nelle donne di giovane età, compresa tra i 20 e i 29 anni, mentre diviene più frequente a partire dai 30 anni, il rischio aumenta sempre più con il progredire dell'età raggiungendo alte percentuali nel periodo menopausale e post-menopausale, tra i 45 e i 60 anni.

La mammella è costituita da circa 15-20 lobi, ciascuno dei quali contiene numerosi piccoli lobuli, strutture ghiandolari che producono il latte, terminanti con minuscoli bulbi. I lobi, i lobuli e i bulbi sono collegati da sottili tubicini chiamati dotti, che si diramano per poi convergere all'areola ovvero una zona cutanea di colore scuro della mammella al centro della quale si trova il capezzolo. Negli spazi tra i lobuli e i dotti si trova del tessuto

adiposo; inoltre nella mammella si intersecano vasi sanguigni e linfatici, questi ultimi trasportano un liquido incolore denominato linfa ai linfonodi, piccoli organi a forma di fagiolo posti sotto la zona ascellare. Uno stroma, costituito da tessuto di sostegno e adiposo, circonda i lobuli, i dotti, i vasi sanguigni ed i vasi linfatici.

I tumori della mammella possono essere suddivisi in:

1. **Epiteliali:** derivanti cioè dalle cellule dell'epitelio ghiandolare, che riveste la parte interna dei dotti e dei lobuli.
2. **Fibroepiteliali:** composti da una componente epiteliale e da componenti mesenchimali o stromali (che sono le “strutture di sostegno” dei componenti ghiandolari)
3. **Mesenchimali:** forme tumorali o pseudotumorali, parte dei quali si osservano anche nei cosiddetti tessuti molli (come cute e sottocute) e non sono pertanto esclusivi della mammella.
4. **Miscellanea:** tumori rari, non raggruppabili nelle classi precedenti.

Di queste quattro classi la più importante, per frequenza e gravità, è rappresentata dalle lesioni epiteliali e mostra una vasta eterogeneità.

I più ricorrenti istotipi sono il carcinoma duttale e quello lobulare, per indicare che la prima forma si sviluppa nei dotti galattofori e la seconda nelle ghiandole galattofore.

I due istotipi possono presentare una forma *in situ* (non invasiva) ed una infiltrante (invasiva). Nel primo caso si tratta di un tumore intraepiteliale, cioè molto superficiale le cui cellule neoplastiche non invadono i tessuti sottostanti e non oltrepassando la membrana basale, non possono estendersi ad altre sedi. L'epitelio non presenta infatti né vasi linfatici né vasi ematici, attraverso i quali le cellule tumorali possono “sfuggire” sfruttando il flusso della circolazione corporea. Tale tipo di neoplasia si può quindi osservare nelle fasi

iniziali della malattia; in base al sito di origine del tumore si distinguerà tra carcinoma duttale *in situ* (DCIS) e carcinoma lobulare *in situ* (LCIS).

Quando le cellule tumorali superano l'epitelio superficiale e diffondono all'interno dei tessuti sottostanti, dotati di vasi linfatici ed ematici, possono raggiungere organi distanti formando nuovi focolai (cervello, polmoni, fegato e ossa sono i foci metastatici più ricorrenti). Si parla in tal caso di tumore infiltrante o invasivo, il più diffuso è l'istotipo duttale (DIC= Ductal Invasive Carcinoma) anche detto NAS (Non Altrimenti Specificato), che rappresenta circa il 75% dei tumori infiltranti, mentre il lobulare circa il 5%. Istotipi infiltranti meno frequenti sono il carcinoma midollare (15%), il colloide o mucinoso (2%), il tubulare (1-2%), ai quali si aggiungono numerose altre forme rare.

## **Malattia delle cellule staminali**

Nell'ultima decade l'opinione sulla biologia del cancro è cambiata drasticamente.

In accordo alla tradizionale visione della tumorigenesi si ritiene ancora oggi che il tumore origini da una singola cellula che ha acquisito alterazioni multiple; la ricerca oncologica molecolare condotta negli ultimi 50 anni ha mostrato che tali eventi genetici (mutazioni) o epigenetici determinano l'attivazione o overespressione di geni che promuovono la proliferazione (oncogeni) ed il silenziamento di geni coinvolti nell'inibizione della proliferazione (geni *tumor suppressor*). Le cellule acquistano un elevato potenziale proliferativo che supporta l'insorgenza e la crescita tumorale.

Secondo il modello dell'evoluzione clonale descritto da Nowell nel 1976 [1] ogni cellula del corpo potrebbe essere *target* della trasformazione maligna. Basandosi su questo tradizionale concetto di tumorigenesi, non si potrebbe spiegare come le attuali terapie



designate ad uccidere cellule proliferanti falliscano nella cura di pazienti colpiti da cancro; inoltre durante lo sviluppo tumorale i tessuti accumulano la serie di alterazioni nell'arco di anni o decenni, tuttavia durante l'autorinnovamento dei tessuti la maggior parte delle cellule sono perse o eliminate nell'arco di tempi brevi, e con la loro perdita potrebbe andare perduta ogni mutazione che hanno acquisito. Pertanto è stato necessario proporre un nuovo modello che potesse spiegare la tumorigenesi umana: un modello verosimilmente basato su alterazioni tumorigeniche a carico di un (rara popolazione) **numero ristretto** di cellule che risiedono a **lungo termine** nei tessuti. Opinione diffusa nell'ambito della comunità scientifica è che le cellule staminali o cellule da esse derivate (progenitori) possono spiegare l'insorgenza e la crescita tumorale così come la chemioresistenza alle convenzionali terapie.

## **Cellule staminali: definizione, classificazione e ruoli**

Cellule staminali (SC) sono cellule non specializzate che mediante divisione asimmetrica danno luogo ad una cellula figlia, che è identica alla cellula staminale originale (*self-renewal*) e ad un'altra cellula chiamata progenitrice (PC) che si divide generando una progenie differenziata.

In base alla potenzialità differenziativa nei diversi tipi cellulari, le SC sono classificate in totipotenti, pluripotenti o multipotenti. Le cellule staminali totipotenti sono in grado di generare anche gli annessi embrionali. Queste cellule sono prodotte da un uovo fecondato fino alla prime 2-3 divisioni (stato di morula). Le cellule staminali pluripotenti sono in grado di differenziarsi in tutti i tipi cellulari del corpo umano, si originano da cellule della massa più interna di una blastocisti e possono originare uno qualsiasi dei tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma). Le cellule staminali multipotenti o

cellule staminali adulte (ASC) mantengono la capacità di autorinnovamento (*self-renewal*), ma sono in grado di differenziarsi verso un *lineage* organo specifico.

In base al numero di divisioni cellulari, ci sono due gruppi con differenti proporzioni di cellule staminali; un gruppo è composto da un piccolo pool di SC normalmente quiescenti (fase G0 del ciclo cellulare) e raramente entrano mitosi, presentano inoltre un potenziale replicativo illimitato e funzionano come riserva cellulare. Il secondo gruppo invece è composto dalla grande maggioranza delle SC che vanno incontro a numerose divisioni simmetriche (generando due SC figlie) svolgendo un ruolo importante durante lo sviluppo o la riparazione dei tessuti danneggiati [2, 3]. Il *self-renewal* dunque coinvolge la capacità della popolazione delle SC a mantenere il loro numero mediante una combinazione di divisioni simmetriche e asimmetriche, tuttavia in alcuni casi si ha l'incremento delle divisioni simmetriche rispetto a quelle asimmetriche come durante la riparazione dei tessuti.

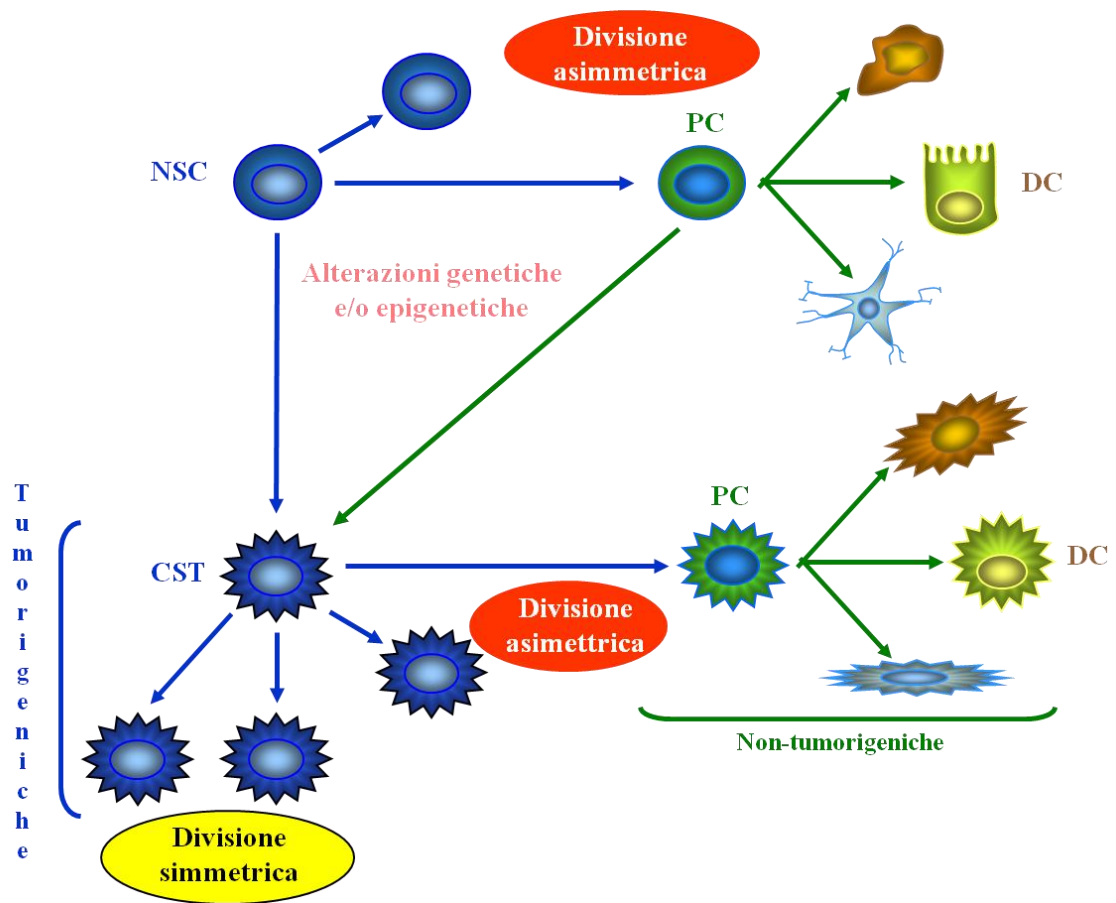
Cellule ciclanti potrebbero accumulare alterazioni genetiche e/o epigenetiche causando carcinogenesi: alterazioni a carico di cellule staminali normali danno origine alle cellule staminali tumorali (CST), chiamate anche “cellule inizianti il tumore” (TIC) e sono estremamente pericolose, perché sono trasmesse a tutte le generazioni delle cellule figlie derivate (Fig. 1 ).

Alternativamente le CST potrebbero derivare da progenitori che acquisiscono caratteristiche di SC [4, 5].

Ciò si tradurrebbe in un pool di cellule staminali che alimenta la formazione e lo sviluppo neoplastico.

Le SC normali e CST condividono molte caratteristiche molecolari e funzionali: l'autorinnovamento cellulare (*self-renewal*), attraverso il coinvolgimento di *pathway*

chiave come Wnt, BMI-1, Notch, Hedgeog, PTEN e P53, è strettamente regolato nelle SC normali invece è del tutto alterato nelle CST. La conoscenza delle alterazioni molecolari



**Figura 1. Cellule staminali normali e tumorali**

Cellule staminali normali (NSC) e tumorali (CST); cellule progenitrici (PC); cellule differenziate (DC).

che sostengono l'autorinnovamento diventa cruciale per l'identificazione di bersagli molecolari per interventi terapeutici potenzialmente altamente selettivi, ma assume anche un significato prognostico.

Le CST come le SC normali mantengono la potenziale capacità di differenziamento in *multilineage* dando vita ad un'organizzazione gerarchica delle popolazioni cellulari. L'ipotesi delle CST spiega così perché i tumori sono composti da popolazioni eterogenee

di tipi cellulari parzialmente differenziati che somigliano a quelli dell'organo normale da cui origina il cancro (organogenesi aberrante). Questo suggerisce un'origine da cellule staminali per i tumori perché solo SC multipotenti o cellule progenitrici *SC-like*, possono generare differenti tipi cellulari.

Inoltre analogamente alle SC, le CST presentano una bassa velocità di crescita (a fronte di un elevato potenziale proliferativo) che le risparmia dagli attuali trattamenti chemioterapici il cui *target* sono invece cellule altamente ciclanti (Daidone, 2010).

La chemioresistenza che caratterizza le CST è da attribuire anche ad un'elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che favoriscono l'efflusso cellulare di farmaci), alla presenza di fattori citoprotettivi, quali attivazione di telomerasi ed elevata espressione di fattori anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-xL, FLIP e PED) [6, 7].

## **Modello dell'evoluzione clonale contro l'ipotesi delle CST**

Il modello delle CST, propone che solo SC e progenitori (1-2% di ogni tessuto o tumore) sono suscettibili a trasformazione neoplastica ovvero possono accumulare addizionali cambiamenti genetici/epigenetici che possono guidare la progressione verso il tumore e la chemioresistenza. Tale modello è supportato dalla lunga vita e dall'alto potenziale proliferativo delle CST.

Secondo il modello stocastico dell'evoluzione clonale invece ogni cellula del corpo potrebbe essere *target* della trasformazione maligna e le cellule figlie di quella trasformata potrebbero acquisire mutazioni addizionali formando una massa tumorale geneticamente

eterogenea capace di crescere e metastatizzare. Una conseguenza è che nel modello delle CST c'è una bassa frequenza di cellule tumorigeniche a differenza di quello clonale.

Le implicazioni terapeutiche di questi modelli prevedono che se la maggior parte dei tumori seguisse il modello dell'evoluzione clonale, tutte le cellule differenziate e proliferanti dovrebbero essere *target* del trattamento antitumorale, a differenza del modello delle CST dove invece la rara popolazione di CST, autorinnovante e che sostiene il tumore, è difficile da colpire pertanto la loro persistenza potrebbe spiegare le recidive tumorali dopo un'apparente successo della terapia dato da una diminuzione della massa tumorale.

Il modello delle CST è dunque probabilmente quello più vicino ad un modello universale di tumorigenesi; tuttavia in accordo a questo modello è stato ipotizzato che alterazioni delle SC originino il cancro, che potrebbe poi progredire attraverso evoluzione clonale delle CST, come nel caso del cancro colon-rettale [8].

In conclusione, il modello stocastico della carcinogenesi e quello delle CST sono mutualmente esclusivi, tuttavia l'evoluzione clonale contribuisce all'eterogeneità genetica dei tumori.

## **Identificazione e isolamento delle SC**

Negli ultimi anni di particolare interesse per la comunità scientifica è stato l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori oltre che nei mielomi [9] anche da neoplasie solide. Tuttavia rimane argomento controverso a causa dell'assenza di criteri morfologici o marcatori specifici in grado di riconoscere le popolazioni cellulari eterogenee all'interno della massa tumorale [10].

Alcuni riferimenti bibliografici si appellano all'analisi della cosiddetta *side-population* (SP) per l'isolamento del CST in base alla capacità delle cellule staminali di escludere il colorante vitale Hoechst 33342, dovuta all'espressione dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette) [11]. Tuttavia, l'analisi della SP estesa alle linee tumorali di tiroide ha dimostrato che entrambi le popolazioni SP e non-SP possono riformare tumori quando impiantati nel sottocute di modelli murini. Di conseguenza, questi risultati suggeriscono che le CST non sono esclusive o identiche alle cellule SP.

In accordo al lento ciclo cellulare, l'identificazione delle SC è stata ottenuta mediante marcatura con bromodeossiridina, ma questo metodo non è preciso e non permette di isolare le cellule vitali.

Inoltre l'isolamento di SC è stato basato anche sull'utilizzo di approcci funzionali quali la crescita clonale *in vitro* sottoforma di sfere non adese.

L'utilizzo di molecole presenti sulla superficie cellulare ne permette una più semplice identificazione, mediante citometria a flusso.

L'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori, mediante uso di marcatori, è stata dimostrata per prima nei mielomi, a cui era associato un fenotipo  $CD34^+CD38^-$  [9]; questo stesso approccio successivamente è stato esteso anche a neoplasie solide quali mammella [12-14] [5], cervello [15-17], prostata [18], colon [19, 20], ovaie [21] e melanoma [22].

Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che nel cancro alla mammella umano la popolazione di cellule con proprietà staminali è associata a marcatori di superficie  $CD44^+CD24^{-/low}$  [12, 23].

Altri dati sperimentali identificano nell'aldeide deidrogenasi1 (ALDH1) un altro marcatore di staminalità; essa appartiene ad un gruppo di enzimi che catalizzano la conversione delle

aldeidi nei corrispondenti acidi che utilizzando  $\text{NAD(P)}^+$  come cofattore e potrebbe avere un ruolo nel differenziamento precoce delle SC mediante ossidazione del retinolo in l'acido retinoico [24]. E' stato dimostrato che cellule staminali/progenitrici ematopoietiche e neurali (umane e murine) presentano un'alta attività dell'enzima ALDH1 [25, 26]. L'incrementata attività ALDH1 è stata osservata per la prima volta, nell'ambito di tumori, in popolazioni di SC nel mieloma multiplo e leucemia mieloide acuta (AML) [9, 27]. Ginestier ha riscontrato elevati livelli di ALDH1 anche in mammosfere umane normali e tumorali, pertanto l'attività di ALDH1 può fornire un comune *marker* per entrambi SC/progenitori normali e tumorali.

Inoltre, l'immunorilevazione di ALDH1 potrebbe rappresentare un semplice metodo per identificare le CST/progenitrici *in situ*, facilitandone l'applicazione clinica.

Infine secondo recenti dati la Citocheratina5 (CK5) è stata deputata come *marker* sia di SC che progenitori bi-potenziati nel normale tessuto mammario [28, 29]. Nell'ambito dei tumori è stato dimostrato che cellule  $\text{CK5}^+$  mostrano proprietà di TIC.

## **CST e metastasi**

Il processo metastatico sembra essere una proprietà innata di una sottopopolazione di CST, denominate "Cellule Staminali Tumorali Migratorie" (mCST), che mantengono le caratteristiche staminali, ma sono capaci di attivare un programma migratorio e invasivo. Poiché le metastasi somigliano al fenotipo eterogeneo del tumore primario, si è ipotizzato che le CST che migrano dalle lesioni primarie rappresentino l'origine della disseminazione metastatica [30].

Dal tumore primario infatti si staccano diversi tipi cellulari, ma solo le staminali tumorali grazie alla loro elevata plasticità e capacità di trans-differenziare, sono capaci di muoversi,

entrare nel sistema circolatorio (intravasazione) e da questo muoversi verso un nuovo tessuto ospite (extravasazione), in cui proliferano formando micro-metastasi, ricche in cellule staminali, ed eventualmente macro-metastasi che somigliano appunto al tumore primario in termini di composizione cellulare ed eterogeneità [31].

L'attitudine migratoria delle mCST non è stata ancora ben caratterizzata, ma sembra che esse risiedano al confine tumore/ospite e possano acquisire un fenotipo tipico della transizione epitelio-mesenchima (EMT).

L'EMT e il suo processo inverso chiamato transizione mesenchimale-epiteliale (MET, *Mesenchymal-Epithelial Transition*) rivestono un ruolo cruciale nell'embriogenesi [32, 33], dove durante le prime fasi dello sviluppo (gastrulazione), l'epitelio embrionale genera il mesoderma e la delaminazione della cresta neurale, che produce una popolazione di cellule con elevata capacità di movimento che migrano e vengono incorporate in tessuti differenti. Una volta migrate alla loro destinazione, le cellule possono revertare al loro fenotipo epiteliale originale attraverso la via MET. Il processo dell'EMT interviene anche nella rigenerazione e riparazione dei tessuti danneggiati.

Risulta chiaro come una deregolazione di tale processo possa avere conseguenze disastrose, soprattutto se acquisito dalle cellule tumorali, che diventano capaci di migrare e raggiungere sedi secondarie e ivi metastatizzare. L'EMT per tal motivo è stato associato sempre più spesso a specifici stadi (i.e., invasazione e intravasazione) [34-36] della progressione tumorale.

Il processo dell'EMT, che porta le cellule di origine epiteliale ad assumere caratteristiche mesenchimali, è accompagnato da una serie di eventi:

depolarizzazione delle cellule epiteliali che perdono anche le loro giunzioni cellula-cellula (mediati dalle caderine e occludine) e cellula-matrice extracellulare (ECM), mediati



dalle integrine e altre molecole consentendo così il distacco dalle altre cellule circostanti e la migrazione verso sedi distali dal tumore primario.

Un altro evento a cui si assiste durante l'EMT è un drastico rimodellamento del citoscheletro, che consente alle cellule di acquisire proprietà migratorie [34, 37].

Associato al processo dell'EMT vi è un nuovo programma trascrizionale attivato per mantenere le caratteristiche mesenchimali; I fattori trascrizionali che si attivano durante l'EMT includono repressori diretti dell'E-Caderina tra cui Snail (anche conosciuto come Snail1), Slug (anche conosciuto come Snail2), SIP-1(ZEB-2), TCF3, KLF8, e repressori indiretti quali Twist, Goosecoid ed NFkB [38]. Tali fattori modulano anche l'espressione di un ampio numero di geni coinvolti nell'invasione tumorale e metastasi. L'overespressione di alcuni di questi fattori si ritrova in molti tumori umani, tra cui quello di mammella, correlando ad una maggiore aggressività del tumore o ricorrenza e prognosi più infausta [39]. Il principale marcatore dell'EMT è l'E-caderina i cui livelli di espressione si riducono in favore di un incremento della N-caderina (Caderina mesenchimale), processo conosciuto come “*cadherin switching*” [40].

Altri marcatori mesenchimali che vengono overespressi sono l' $\alpha$ -Actina del muscolo liscio (SMA) e la Vimentina, mentre vengono ridotti i livelli di *marker* epiteliali come le Citocheratine18.

L'EMT può essere indotto da diversi stimoli del microambiente circostante inclusi l'ipossia, componenti della matrice extracellulare come collagene e acido ialuronico e da fattori solubili come il Fattore di crescita degli epatociti (HGF), EGF, Wnt, il fattore di crescita trasformante- $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), Hedgehog e citochine [41].

Recenti dati hanno dimostrato una relazione esistente tra EMT e il fenotipo delle CST. Ciò ha gettato una nuova luce nella comprensione del processo metastatico, infatti se la

maggior parte delle cellule che lasciano il tumore primario non avessero questa capacità di auto-rinnovamento, la probabilità di trovare macrometastasi verrebbe ad essere un evento eccessivamente raro, a causa del limitato potenziale proliferativo delle cellule differenziate.

## **Caratterizzazione molecolare e fenotipica dei sottotipi di cancro alla mammella**

L'Analisi dell'espressione genica nel cancro alla mammella, ne ha permesso una subclassificazione molecolare in cinque sottotipi: luminale A, luminale B, HER2-arricchito, *basal-like* e *claudin-low*.

**Luminal A** è caratterizzato dall'espressione (94%) [42] dei recettori per l'ormone femminile steroideo degli estrogeni (ER). Questi tumori sono di solito positivi anche per il recettore del progesterone (PR), anche se esiste un *subset* di tumori ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> [43]; inoltre esprimono altri marcatori luminali come la proteina epitelio-specifico del filamento intermedio citocheratina (CK)18 e Muc1, e può essere positivo (9%) o negativo (92%) [42] per il recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2) [44]. In accordo con questo *pattern* genico, I tumori luminali sono costituiti principalmente da cellule differenziate e per lo più responsivi ai trattamenti ormonali che ne bloccano la crescita guidata da estrogeni/ER, pertanto hanno una prognosi molto più favorevole rispetto a quelli con fenotipo triplo negativo (TNP), che mancano di ER, PR e HER2 (4-5%) [23], fenotipo a cui corrispondono recidive locali e disseminazione in sedi distanti che restano un problema critico e principale causa di morte per i tumori luminali.

Il **Basal-like (BL)** è caratterizzato da bassa o assente espressione genica di marcatori luminali: ER<sup>-</sup> (91%) [42], PR<sup>-/low</sup>, HER<sup>-/low</sup> (90%) [42], infatti in questo sottotipo è alta la

percentuale (39-54%) di TNP [23]. Inoltre esprimono bassi livelli di altri marcatori luminali come GATA3 e CK18 e 19, di contro sono altamente espresse le citocheratine basali CK5, CK14 e CK17. Nell'ambito dei *marker* di SC/progenitori i BL mostrano elevata espressione genica di molecole CD44, CD49f e ALDH-1 invece bassa espressione di marcatori di differenziamento epiteliale tra cui CD24, EpCAM e MUC1; tuttavia recentissime evidenze sperimentali affermano che nel BL i livelli di CD24/EpCAM e ALDH-1 non siano significativamente bassi e alti rispettivamente [23]; Pertanto all'interno di tumori basali si ritrovano popolazioni cellulari  $CD44^{+}CD24^{low/+}$  e  $CD49f^{+/high}EpCAM^{+}$ .

Thompson&Neve hanno inoltre evidenziato come in questi tipi di tumori sia elevata l'espressione genica di *marker* di EMT la cui funzione predominante è di reprimere l'E-Caderina (glicoproteina di adesione cellula-cellula calcio dipendente) in maniera diretta mediante Snail1, Snail2, Zeb1, Zeb2, TCF3 invece i repressori indiretti includono Twist1, Twist2, Id1, TCF4, FOX2 e NFkB [38].

Il profilo molecolare del BL è dunque coerente con un arricchimento di cellule epiteliali tumorali indifferenziate ed esprimenti caratteristiche mesenchimali, ovvero un'alta densità di TIC/CST il cui fenotipo antigenico coincide infatti con il *pattern* di espressione genico del BL.

L'alta percentuale di cellule SC/progenitori nel BL sarebbe la causa della resistenza verso le attuali terapie ormonali e chemioterapiche, ed è pertanto associato ad una prognosi più infausta rispetto ai sottotipi luminali.

Il ***Cludin-low (CL)*** è un nuovo sottotipo molecolare identificato recentemente (2007) il cui nome deriva dai bassi livelli di espressione di geni coinvolti nelle giunzioni occludenti, quali la Claudina 3, 4, 7 e l'Occludina. Il *pattern* molecolare e il fenotipo di questi sottotipi tumorali è molto somigliante ai BL infatti anch'essi presentano un'alta percentuale (25-

39%) di TNP, sono caratterizzati da negatività per le citocheratine luminali CK18 e 19 e alta espressione delle citocheratine basali CK5, CK14 e CK17. Inoltre i tumori CL presentano elevata densità di popolazioni cellulari a cui è associato il fenotipo  $CD44^{+/high}CD24^{-/low}$  e  $CD49f^{+/high}EpCAM^{-}$  ed alti livelli di ALDH-1 a differenza del BL.

Studi condotti da Thompson&Neve evidenziano che anche in questi sottotipi tumorali ci sia un'espressione genica di *marker* di EMT ancora più elevata rispetto al BL; tuttavia stessi studi dimostrano come le spiccate caratteristiche mesenchimali presenti nelle cellule dei CL così come nei BL, siano associate solo a cellule epiteliali tumorali e non dovute a contaminazioni da stroma adiacente [23].

E' stato osservato inoltre che nei CL vi è un'elevata espressione di geni coinvolti nella risposta del sistema immunitario (CD79, CD14, VAV1), questo dato suggerisce un potenziale reclutamento di diversi tipi di leucociti in questo tipo di tumori.

Il CL, in accordo con l'elevata espressione di marcatori mesenchimali/SC, presenta una più elevata percentuale di TIC/SC/progenitori rispetto al BL che li rende leggermente sensibili al trattamento chemioterapico (neoadiuvanti antracicline/taxano) ma complessivamente non possono essere debellati e pertanto legati ad una prognosi molto infausta.

**Luminali B** presentano un profilo molecolare e fenotipico  $HR^{+}(ER^{+} PR^{+})/HER2^{-}$  nel 72% dei casi; tumori luminali  $HER2^{+}$  (20%) sono principalmente di tipo B [42].

La proteina Ki-67 è stata studiata come potenziale *marker* di immunoistochimica (IHC) che potrebbe distinguere i sottotipi luminali B da quelli A. Tumori ad alta espressione di Ki-67 (quindi altamente proliferativi) sono stati associati al luminale B al contrario dei luminali di tipo A [45].

Kabos&Horwitz (2010) hanno mostrato che questo tipo di carcinoma mammario presenta una certa eterogeneità.

Studi dimostrano [42] come il sottotipo luminale B sia non solo relativamente (rispetto ai BL e HER2-arricchito) chemio-insensibile (antracicline/taxano) ma anche resistente alla terapia ormonale. La biologia dei luminali B potrebbe essere spiegata dai meccanismi di resistenza della terapia ormonale [46] tra cui l'attivazione ligando-indipendente di ER mediante la famiglia di recettori HER, che potrebbe causare resistenza alle terapie endocrine nei tumori basali  $ER^+/HER2^+$  ma anche in quelli  $ER^+/HER2^-$  grazie ad un'attivazione in maniera alternativa del segnale di HER [47, 48]. Due trial clinici hanno testato quest'ipotesi dimostrando che una terapia combinata, endocrina e anti-HER2 (trastuzumab), aumentava la sopravvivenza in pazienti con cancro alla mammella  $HR^+/HER2^+$  metastatico [49]. Tuttavia molti pazienti  $HER2^+$  non beneficiano della terapia col trastuzumab.

Il sottotipo **HER2-arricchito** è caratterizzato da un'overespressione del recettore HER2, sebbene ~30% sia clinicamente  $HER2^-$  [42] inoltre mostra principalmente (69%) negatività per ER; I tumori appartenenti a questo sottotipo presentano la perdita di espressione di *cluster* genici basali e bassa espressione di *cluster* genici luminali se paragonata a quella dei luminali A e B [42]. Le popolazioni cellulari appartenenti a questo sottotipo presentano alti livelli trascrizionali di CD24 [23]. Studi recenti [42] mostrano un'alta chemio-sensibilità (antracicline/taxano) del sottotipo HER2-arricchito e *Basal-like* (ampiamente ER-negativi), tuttavia a dispetto dell'elevata risposta alla chemioterapia, la comparsa di recidive dovuta alla “malattia minima residua” migliora di gran lunga la sopravvivenza libera da progressione della malattia nei pazienti con tumori  $ER^+$  (principalmente luminali).

La caratterizzazione molecolare e fenotipica mostra come sottotipi intrinseci di cancro alla mammella potrebbero essere costituiti da cellule somiglianti a quelle del tessuto normale a

differenti stadi di differenziamento così come evidenziato da recenti studi di Lim et al. (2009).

Sull'origine dello sviluppo dei sottotipi intrinseci sono state avanzate diverse ipotesi; una di queste, coerentemente alla teoria delle CST, sostiene che le SC potrebbero essere l'origine di ogni sottotipo intrinseco. In questo contesto le cellule SC trasformate sono capaci di andare incontro a divisione simmetrica e asimmetrica, quest'ultima capace di generare cellule differenziate che si arrestano ad uno specifico stadio differenziamento dipendente dal particolare sottotipo tumorale. Esisterebbe pertanto un *bulk* tumorale costituito da cellule più o meno differenziate, con una sottopopolazione di cellule con caratteristiche di CST/TIC.

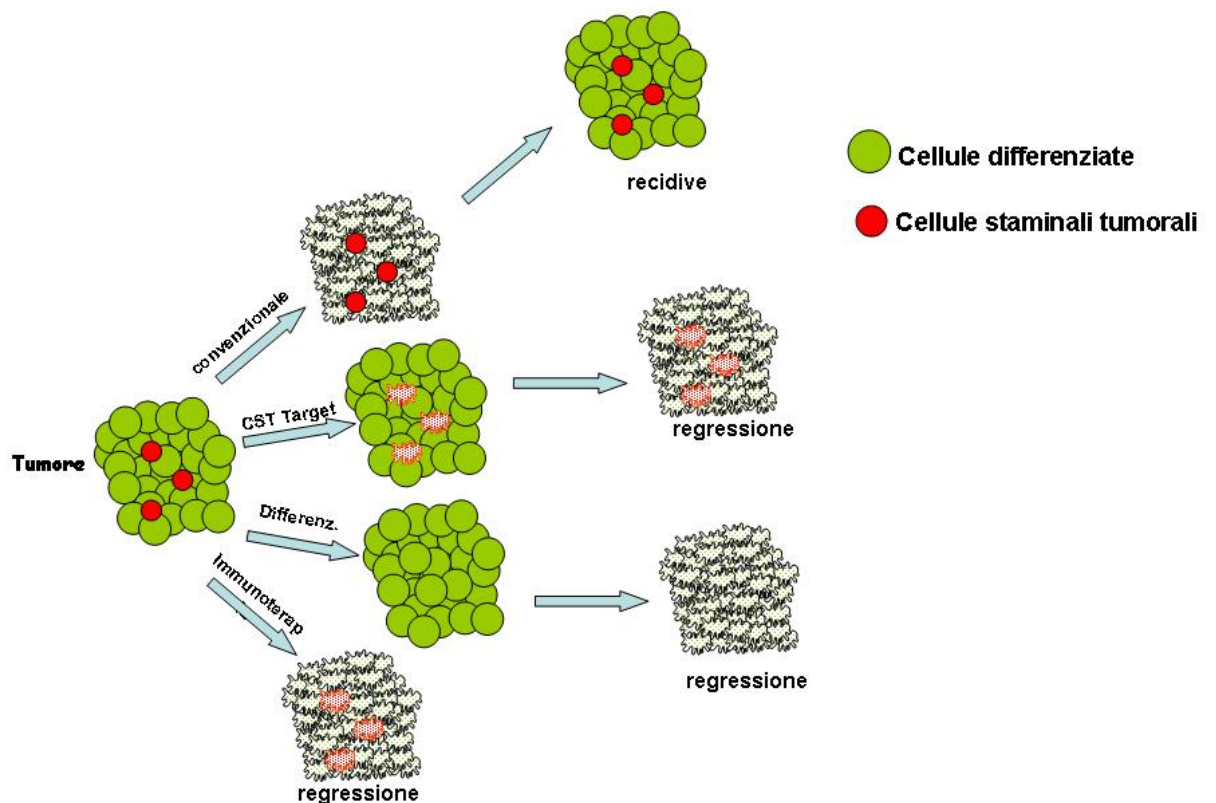
Secondo un'altra ipotesi i diversi sottotipi molecolari potrebbero originare non direttamente da alterazioni di SC bensì da CST derivate da un de-differenziamento di cellule differenziate trasformate in senso neoplastico [42]. Altri autori sostengono tuttavia che i diversi sottotipi potrebbero originare da cellule trasformate che si trovano a diversi livelli lungo l'asse di differenziamento luminale della mammella normale. In questo contesto le SC darebbero origine a tumori CL, progenitori luminali al BL e cellule luminali mature ai tumori luminali A e B; tuttavia quest'ipotesi contrasta con altri studi (a sostegno della teoria delle CST) secondo cui una più o meno bassa percentuale di TIC/CST ( $CD44^{+}/CD24^{-}$ ) è osservata in tutti i sottotipi tumorali [42]. Numerose evidenze sperimentali tuttavia hanno supportato che l'origine del CL e BL siano le SC, al contrario per i sottotipi più differenziati (Luminale A, B e HER2 arricchito) non è molto chiaro. In questo contesto Prat&Perou (2011) sono più favorevoli ad una combinazione di queste teorie: CL e BL originerebbero dalla trasformazione di una SC, con limitata differenziazione in progenitori luminali nel caso di tumori BL, invece tumori luminali potrebbero originare da una trasformazione di cellule differenziate.

## **CST: promettente bersaglio della terapia anticancro**

Gli attuali protocolli terapeutici oncologici (chemioterapici, ormonali e radioterapici) provocano una significativa riduzione della massa tumorale, attualmente considerata un indicatore di risposta clinica e conseguentemente di sopravvivenza del paziente. Tuttavia tali terapie colpiscono solo la componente cellulare più differenziata, mantenendo inalterata la frazione di CST/TIC, ovvero quella sottopopolazione in grado di rigenerare la neoplasia (Fig. 2) sia a livello locale sia a distanza (metastasi). Inoltre, sempre maggiori evidenze suggeriscono che terapie anticancro potrebbero arricchire la popolazione di CST, come riportato nel contesto del cancro al colon e pancreas trattati con oxaliplatino e gemcitabina rispettivamente [50-52].

Per l'eradicazione del tumore è ipotizzabile che sia necessario bersagliare direttamente le SC/progenitori tumorali (Fig. 2); a tale scopo gruppi di ricerca si sono occupati di identificare le alterazioni molecolari che sostengono l'autorinnovamento nelle cellule ad elevato potenziale tumorigenico (CST/progenitori) e quindi disegnare e validare a livello preclinico molecole che interferiscano su tali bersagli.

Per il carcinoma alla mammella è stato recentemente dimostrato che Wnt, implicato nella tumorigenesi e mantenimento di un pool di SC/progenitori nella ghiandola mammaria, è coinvolto in un *cross-talk* con ER e PR interferendo sulla sua funzionalità, mediante



**Fig. 2 terapie antineoplastiche**

Terapia convenzionale: farmaci chemioterapici, adiuvanti (cetuximab) e terapie ormonali.

Terapia target con CST: inibitori dei *pathway* di sopravvivenza (antagonista di IL-4Ra, anticorpo neutralizzante IL-4, inibitori del pathway di Wnt).

Terapia di differenziamento: Salinomicina, BMP-4.

Terapia immune: cellule  $\gamma \delta T$ .

antagonisti specifici o siRNA, si spinge il differenziamento delle cellule tumorigeniche sensibilizzandole ai convenzionali trattamenti anticancro.

Alterazioni del pathway di Hedgehog sono coinvolti nello sviluppo di differenti patologie neoplastiche, inclusa quella mammaria; recenti studi mostrano che la ciclopamina, un alcaloide che interferisce specificamente su questo *pathway*, riduce l'espressione di Gli1 e rallenta significativamente la crescita tumorale [53].



Notch ha un ruolo importante in diverse patologie neoplastiche, Notch 4 in particolare è associato alla proliferazione delle mammosfere; è stato visto che il trattamento con un anticorpo diretto contro Notch 4 sopprime drasticamente la formazione di sfere sia primarie che secondarie [14, 54, 55].

Nel contesto delle CST di colon, il gruppo del Prof. Stassi ha riportato che l'inibizione del *pathway* attivato dall'IL4 mediante un antagonista del recettore  $\alpha$  dell'IL4 (IL-4R $\alpha$ ) o un anticorpo neutralizzante IL-4, sensibilizza fortemente le CST ai chemioterapici grazie ad una *down-regulation* di proteine antiapoptotiche come cFLIP, Bcl-xL e PED [51].

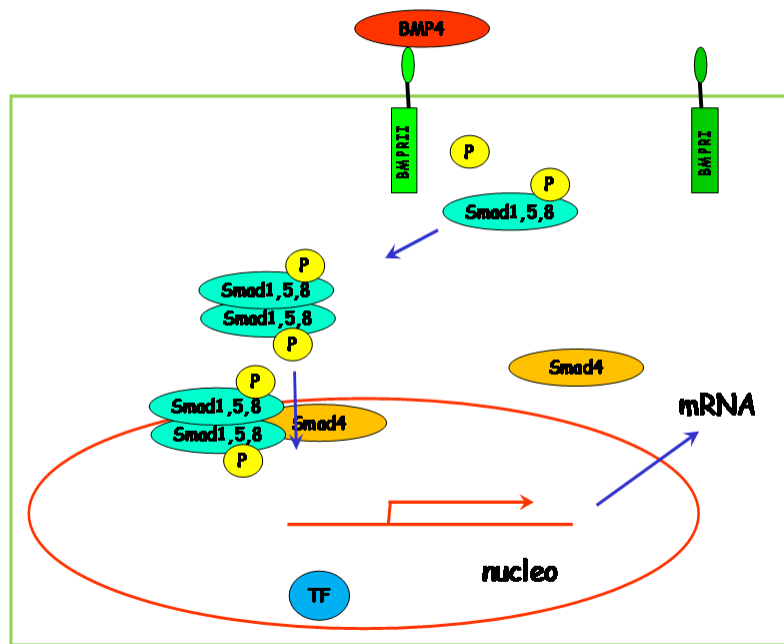
Recenti evidenze sperimentali hanno evidenziato che anche il potenziamento della risposta immunitaria è un utile approccio contro la popolazione di cellule tumorigeniche; Todaro et al. hanno infatti dimostrato che il trattamento delle CST di colon con zoledronato bifosfonato induce un'efficiente risposta dei linfociti T  $\delta\gamma$  [56].

Altri approcci terapeutici per il trattamento di una varietà di tumori prevedono l'induzione del differenziamento delle CST, che acquisiscono maggiore sensibilità agli attuali trattamenti anticancro.

Recenti studi dimostrano che una molecola elettiva per questo tipo di approccio è la BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein-4*); è un membro della famiglia BMP, ed appartiene alla superfamiglia dei TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-beta*) che include un elevato numero di fattori di crescita e di differenziamento.

Le BMP esercitano le loro funzioni attraverso complessi recettoriali serina/treonina chinasi di tipo I e II. Nei mammiferi esistono tre recettori BMP di tipo I [ALK2 (*Activin Receptor-like Kinase-2*), ALK3/ BMPR1A e ALK6 /BMPR1B] e tre recettori di tipo II: [BMPR-II, ActR-IIA (*Activin type II Receptor*) e ActR-IIB]; la diversa combinazione dei recettori di tipo I e II determina la specificità per i ligandi.

I recettori di tipo I e II funzionano da protein-chinasi, fosforilando i substrati intracellulari regolati da BMP (Smads 1, 5 e 8) e da TGF ( Smads 2 e 3) che fosforilati si associano con la proteina Smad 4 per formare nel citosol plasma complessi multi-proteici che traslocano nel nucleo dove attivano la trascrizione dei geni bersaglio [57] (Fig. 3).



**Fig. 3 Schema rappresentativo del pathway di BMP4**

Oltre al *pathway* delle Smad, le BMP attivano un segnale alternativo, che comprende P38 e le chinasi MAP ed ERK [58]. Inoltre, l'attivazione delle BMP è strettamente regolata dalla presenza o l'assenza di antagonisti, come Gremlina, Chordina e Noggin [59].

In origine queste proteine sono state studiate e caratterizzate per la loro abilità condrogenica e osteogenica, in quanto sono in grado di indurre ectopicamente formazione di estratti di osso demineralizzati in un sito extrascheletrico *in vivo* [60]. In seguito, le BMP sono state analizzate per il loro ruolo nella crescita cellulare, differenziamento e apoptosi.

Studi condotti inizialmente su invertebrati (*Drosophila melanogaster* and *Xenopus leavis*) [61, 62] e poi estesi su vertebrati, hanno permesso di affermare che le BMP sono coinvolte nello sviluppo embrionale giocando un ruolo durante il differenziamento delle SC [63].

Considerato il ruolo nella regolazione del differenziamento delle BMP è stato possibile supporre che il trattamento delle CST con queste molecole potesse indurre il differenziamento e la sensibilizzazione ai trattamenti antitumorali. Alcuni studi preliminari sono stati eseguiti sulle CST di glioblastoma e colon;

Nel glioblastoma il trattamento con BMP2, BMP4 e BMP7 inibisce la formazione di sfere ed induce il differenziamento delle cellule CD133<sup>+</sup>, inoltre il pretrattamento della popolazione CD133<sup>+</sup> con queste citochine attenua la formazione di tumori nei topi [64, 65].

Recentemente, gli stessi risultati sono stati ottenuti nelle CST colon-rettali (CR-CST): Il trattamento con BMP4 di cellule CR-CST CD133<sup>+</sup> ne induce differenziamento *in vitro* e stimola l'apoptosi diminuendo l'attivazione della  $\beta$ -catenina mediante l'inibizione del *pathway* di fosfatidil-inositolo3'-chinasi (PI3K)/c-Akt (PKB) e un'overespressione dei regolatori negativi di Wnt. In seguito a trattamento con BMP4 la popolazione CR-CST CD133<sup>+</sup> presenta un ridotto potenziale tumorigenico; Inoltre *in vivo* il trattamento combinato di BMP4 con i convenzionali chemioterapici (oxaliplatino e 5-FU), riduce le dimensioni del tumore; Questi dati supportano quindi l'uso combinato di agenti differenziativi e citotossici per la terapia anticancro [66].

Alle nuove terapie anticancro capaci di indurre il differenziamento delle CST appartiene la salinomicina, che è uno ionoforo altamente selettivo per il potassio (K<sup>+</sup>); recenti studi condotti da Gupta et al. in tumori alla mammella hanno dimostrato che la salinomicina è in grado di colpire selettivamente le CST inducendone terminale differenziamento epiteliale ed eradicando quindi il tumore. Questi stessi studi hanno inoltre rivelato che il trattamento

con salinomicina determina una significativa diminuzione della popolazione CD44<sup>high</sup>CD24<sup>-/low</sup> a differenza del paclitaxel (taxolo) che ha invece effetti opposti. Tale ionoforo è inoltre capace di revertare il fenotipo mesenchimale delle CST in epiteliale. Esperimenti *in vivo* condotti su topi hanno evidenziato infine che il pretrattamento di linee cellulari tumorali di mammella (SUM159) con salinomicina (o paclitaxel) ritarda (di 14 giorni circa) la formazione del tumore. Tuttavia il meccanismo d'azione di questa molecola è ancora oggetto di studio, ma si ipotizza possa interferire con i canali del K<sup>+</sup> coinvolti nella regolazione della migrazione cellulare e pertanto inibire l'EMT e conseguentemente il processo metastatico [67]. In conclusione ci sono prove sperimentali che suggeriscono un possibile uso di inibitori dei *pathway* di sopravvivenza, cellule del sistema immunitario e agenti inducenti il differenziamento in combinazione con chemioterapici ad azione citotossica, per il trattamento del cancro.

# **RISULTATI**

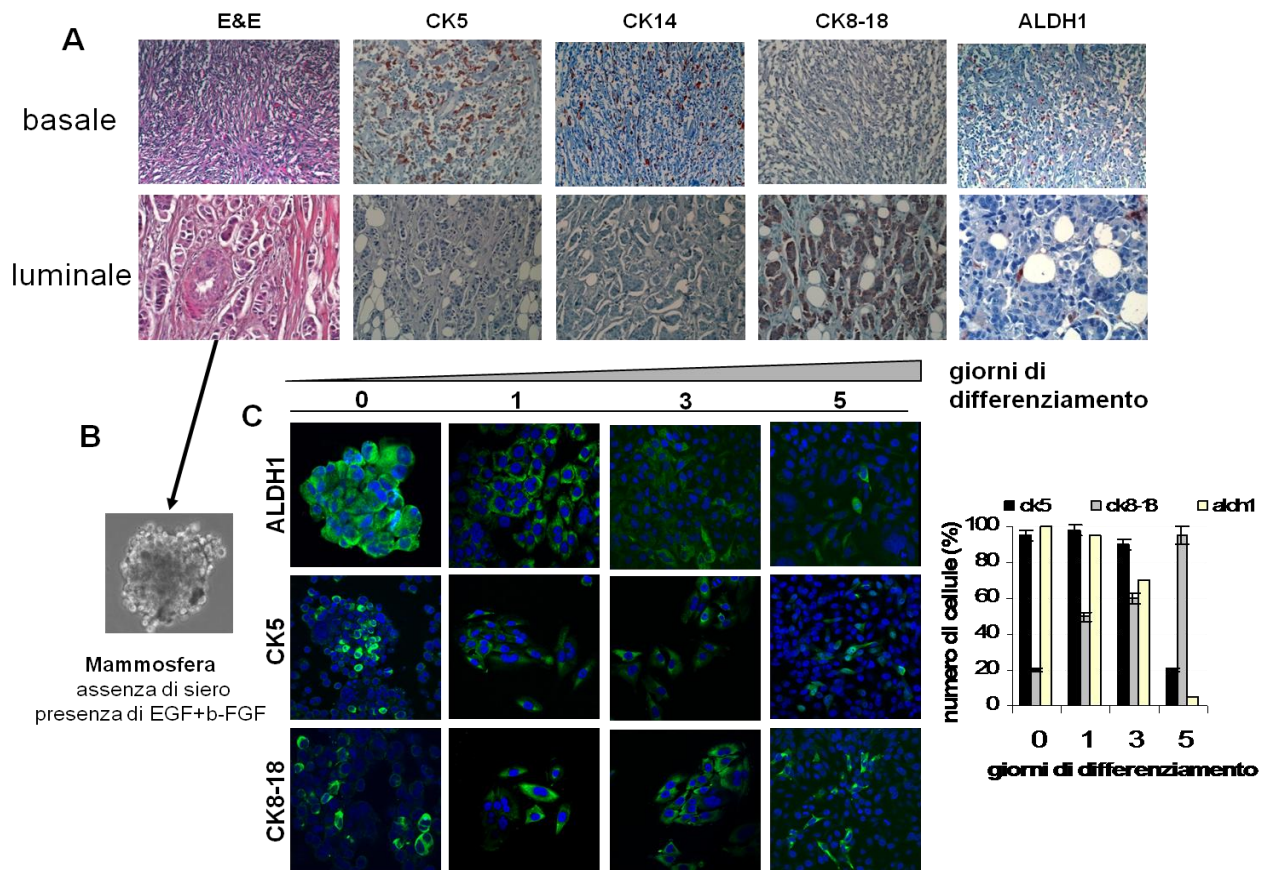
## **Caratterizzazione molecolare e fenotipica di carcinomi mammari**

Al fine di caratterizzare a livello molecolare e fenotipico i campioni di tumore alla mammella umana usati nelle successive indagini sperimentali, sono state utilizzate le citocheratine (CK), marcatori di cellule di origine epiteliale.

Le indagini d'immunoistochimica condotte su sezioni paraffinate di tumore alla mammella hanno evidenziato che alcuni carcinomi mostravano positività per le citocheratine basali CK5 e CK14 e negatività per la citocheratina luminale CK8-18; a questi campioni, in accordo con i dati presenti in letteratura [23, 68], è stato associato un fenotipo *basal-like*. Al contrario è stato associato un fenotipo luminale a campioni CK8-18<sup>+</sup> CK5<sup>-</sup> e CK14<sup>-</sup> (Fig. 1A).

Nei suddetti tumori sono stati saggiati anche i livelli d'espressione di ER, PR e HER2 mediante *immunostaining*, dall'Unità Operativa di Anatomia Patologica del Policlinico di Palermo. I tumori basali sono risultati ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> e HER2<sup>+</sup> invece i tumori con fenotipo luminale ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> (dati non mostrati).

Sono stati analizzati anche i livelli d'espressione dei *marker* di TIC/SC quale l'enzima ALDH1A1 recentemente proposto come un altro *marker* SC di mammella insieme a CD44 e CD49f [23].



**Figura 1. Caratterizzazione molecolare e fenotipica di tumori alla mammella**

(A) Colorazione ematossilina/eosina (E&E) e analisi immunoistochimica (IHC) di CK5, CK14, CK8-18 e ALDH rivelata mediante AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di cancro alla mammella. I nuclei sono stati rivelati mediante colorazione con ematossilina (blu). E' mostrato un rappresentativo tumore basale e luminale dei 4 differenti carcinomi mammari.

(B) Mammosfera tumorale ottenuta in *stem cell medium* supplementato con EGF e b-FGF in fiasca *ultra low adhesion*.

(C) Analisi a microscopia confocale di ALDH, CK5, CK14, CK8-18 (colore verde) su mammosfere tumorali in presenza di 5% FBS per 0-1-3 e 5 giorni. I nuclei (colore blu) sono stati contrastati mediante Toto-3 (sinistra).

Numero di cellule positive in termini di percentuale dello *staining* di Fig. 1C (destra).

E' mostrato un rappresentativo tumore di 4 diversi carcinomi mammari.

L'indagine d'immunoistochimica ha rivelato che nei tumori luminali l'espressione di ALDH1 è assente a differenza dei tumori basali in cui è espresso a livelli non significativamente alti (Fig. 1A).

Questi risultati concordano con i dati in letteratura secondo i quali i sottotipi basali dei tumori alla mammella sono arricchiti di una sottopopolazione di TIC/SC  $ER^{-}$ ,  $PR^{-}$ ,  $CK5^{+}$  che li rende resistenti ai trattamenti standard endocrini e chemioterapici. Al contrario i sottotipi luminali, sono caratterizzati da cellule più differenziate  $ER^{+}$ ,  $PR^{+}$ ,  $CK5^{-}$  [23, 69].

Le CST utilizzate nei successivi esperimenti sono state isolate da pezzi operatori tumorali sia basali che luminali e successivamente propagate in coltura in un terreno selettivo per SC sottoforma di sfere (Fig. 1B) dimostrando come le CST isolate abbiano mantenuto il loro potenziale tumorigenico *in vitro*.

Al fine di caratterizzare le CST è stata condotta un'analisi d'immunofluorescenza per ALDH1A1, CK5 e CK8/18 in mammosfere tumorali e la loro progenie differenziata ottenuta dalla loro dissociazione e seguita dalla piastratura in coltura in presenza di FBS (per 1-3-5 giorni).

Le mammosfere risultano  $ALDH1A1^{+}$ ,  $CK5^{+}$ ,  $CK8/18^{-}$  al contrario della progenie differenziata in cui all'aumentare del tempo di differenziamento si assiste ad una riduzione dei livelli di CK5 e ALDH1A1 e ad un aumento della CK8/18 (Fig. 1C).

Questi dati dimostrano che le mammosfere isolate dai campioni tumorali e mantenute in coltura conservano un fenotipo staminale.

## **L'inibizione dell'IL4 amplifica la risposta tumorale alla morte indotta dal chemioterapico *in vitro***

Recenti dati pubblicati [51] hanno mostrato che le cellule tumorali epiteliali producono autocrinamente la citochina IL4 che agirebbe come fattore di sopravvivenza e la sua

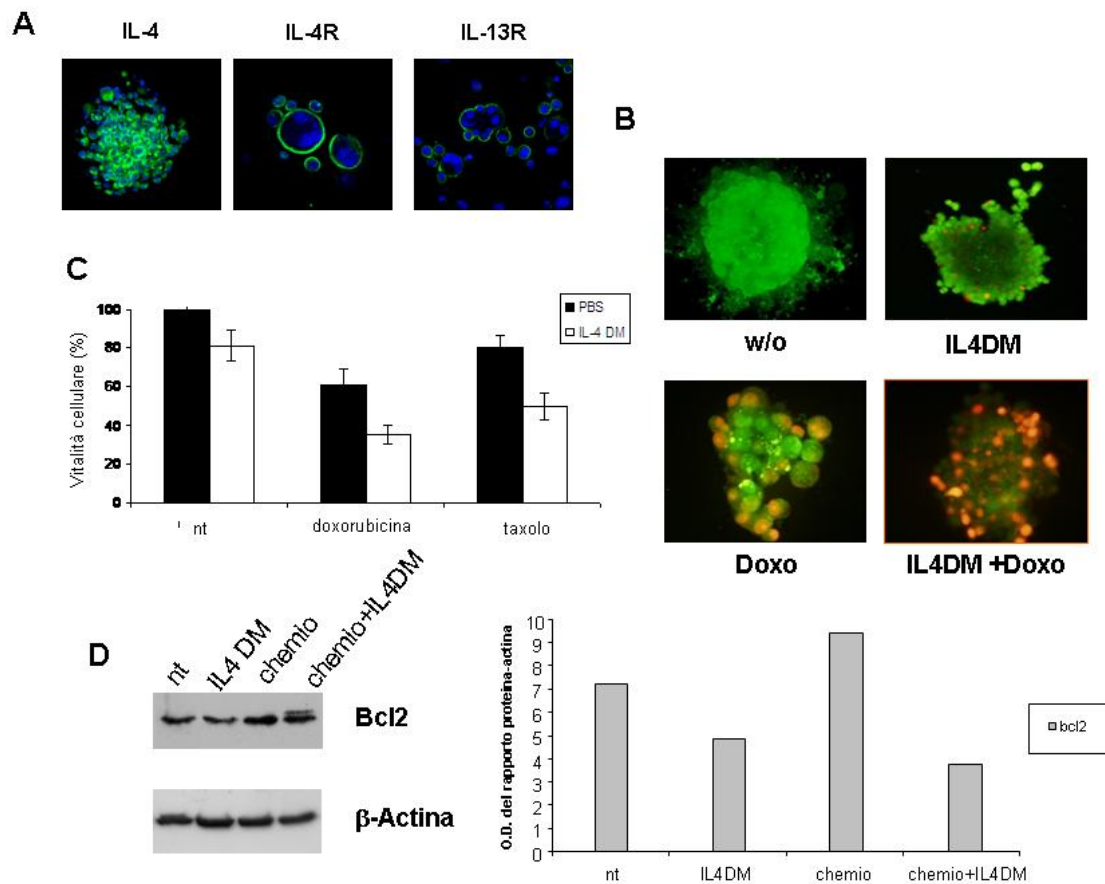
neutralizzazione porta alla *down*-modulazione di proteine antiapoptotiche sensibilizzando in tal modo le cellule tumorali ai chemioterapici.

Al fine di studiare il ruolo dell'IL4 nel nostro sistema cellulare, sono stati saggiati mediante immunofluorescenza i livelli di espressione dell'IL4 e delle catene IL4-R $\alpha$ , IL13-R $\alpha$ 1 che eterodimerizzano formando un complesso recettoriale ad alta affinità per l'IL4 e minore per IL13 [70].

L'indagine ha mostrato che le sfere tumorali esprimono l'IL4 (alti livelli), IL4-R $\alpha$  e IL13-R suggerendo che nelle CST di mammella potrebbe essere attivato il *pathway* autocrino dell'IL-4 [51] (Fig. 2A).

Per indagare se IL-4 costituisce un fattore di sopravvivenza per le CST di mammella, queste sono state trattate con un antagonista competitivo di IL4-R $\alpha$  caratterizzato da una doppia mutazione in posizione 121 (Arg→Asp) e 124 (Tyr→Asp) [71] della molecola IL-4 (IL-4DM), ed usato come strategia volta ad inibire l'IL-4 e IL-13. Successivamente è stata saggiata la vitalità cellulare (resistenza ai chemioterapici) nelle stesse mammosfere tumorali mediante saggio di *orange acridine* ed MTT. Il singolo trattamento con IL4DM o chemioterapico (doxorubicina o taxolo) aumenta la morte cellulare rispetto alle cellule non trattate, tuttavia IL-4DM in combinazione al chemioterapico ha un effetto sinergico sulla morte cellulare (Fig 2B e 2C). Per validare questi risultati è stata condotta anche un'analisi western blot che ha rivelato una riduzione dei livelli d'espressione della proteina antiapoptotica Bcl2 nelle CST di mammella trattate con IL-4DM ma una riduzione ancora più significativa nelle cellule doppiamente trattate con IL-4DM insieme ai chemioterapici (Fig 2D).





**Figura 2. Effetto *in vitro* dell'IL4DM sulla risposta tumorale alla morte indotta dal chemioterapico.**

(A) Analisi d'immunofluorescenza di IL4, IL4-R $\alpha$ , IL13-R $\alpha$ 1 in citocentrifugati di mammosfere. I nuclei sono stati contrastati mediante Toto-3 (colore blu).

(B) Colorazione arancio acridina/etidio bromuro di sfere di mammella in seguito a trattamento di IL4DM, doxorubicina e cotrattamento IL4DM più doxorubicina (verde, cellule vitali; rosso, cellule morte).

(C) Percentuale di vitalità cellulare in sfere di mammella trattate con IL4DM, chemioterapico (doxorubicina o taxolo) o in combinazione. Le cellule erano pretrattate per 24h con IL4DM e poi poste in coltura con doxorubicina o taxolo per 48h. Cellule trattate con PBS sono state usate come controllo.

(D) Analisi d'immunoblotting di Bcl2 in sfere non trattati (nt), trattati con IL4DM, chemioterapico (doxorubicina o taxolo) e chemioterapico più IL4DM. La normalizzazione è stata realizzata mediante  $\beta$ -actina (sinistra).

Analisi OD del rapporto proteina/actina per quantificare i dati della Fig. 2D (destra).

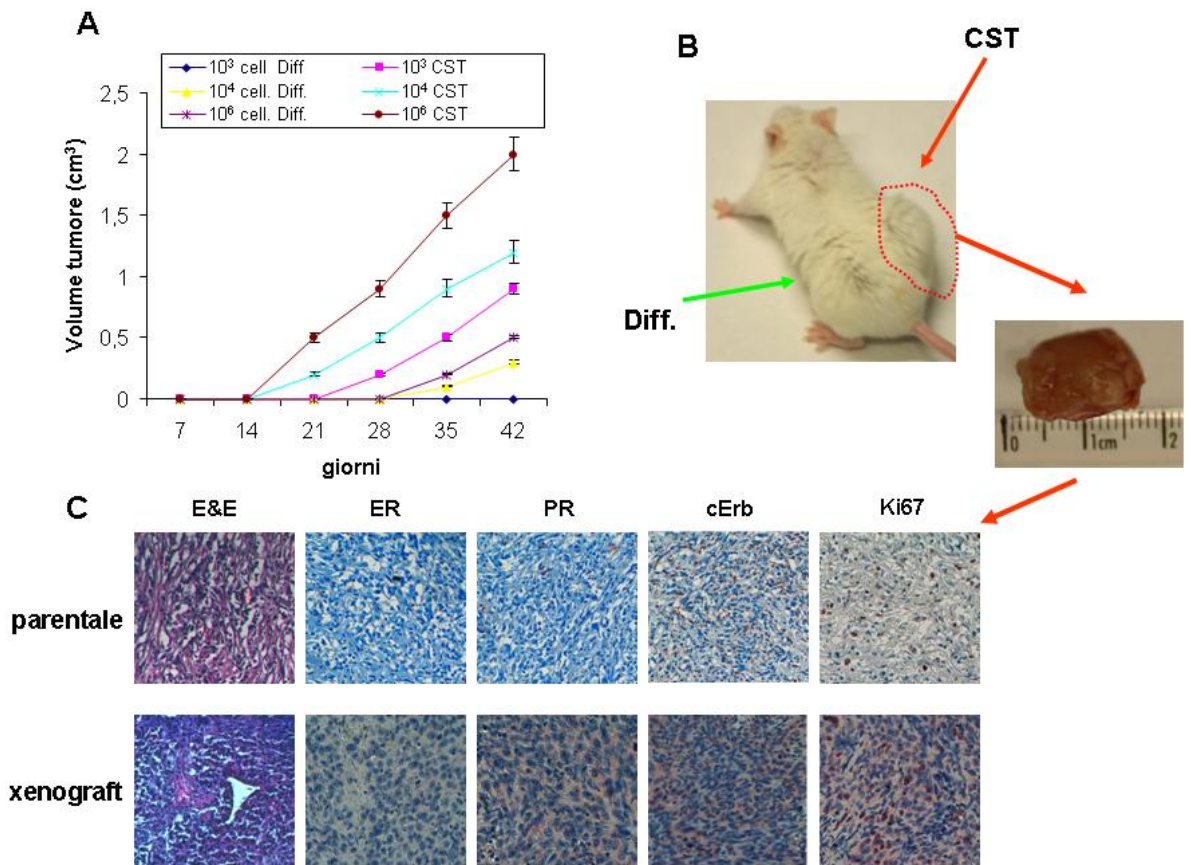
E' mostrato uno di tre indipendenti esperimenti.

Questi dati suggeriscono quindi che IL-4 nella mammella agisce da fattore di sopravvivenza proteggendo le CST dalla morte cellulare indotta dai chemioterapici probabilmente attraverso un'overespressione di proteine antiapoptotiche; pertanto l'inibizione del segnale attivato dall'IL4 potrebbe sensibilizzare maggiormente all'azione del chemioterapico.

### **Sfere di mammella mantengono il potenziale tumorigenico *in vivo***

La capacità delle mammosfere tumorali umane di rigenerare tumore *in vivo* è stata esaminata sia nei tumori a cui è stato associato un fenotipo basale che luminale, inoculando ortotopicamente diluizioni seriali ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ) di CST e delle stesse cellule differenziate (10 giorni) in due gruppi di topi NOD/SCID. La cinetica di crescita tumorale, analizzata settimanalmente, ha seguito lo stesso andamento sia nei tumori basali che luminali tuttavia le mammosfere hanno rigenerato tumori più velocemente delle cellule differenziate. E' quindi evidente che le sfere di mammella abbiano un potenziale tumorigenico maggiore rispetto alle stesse differenziate (Fig. 3A e B).

Per studiare inoltre se gli *xenograft* ottenuti mantenessero o meno lo stesso fenotipo del tumore parentale, gli xenotrapianti sono stati caratterizzati attraverso ematossilina/eosina (E&E) ed immunoistochimica per ER, PR, HER-2, Ck5, Ck8-18 e Ki67. L'indagine ha evidenziato che il fenotipo del parentale si mantiene anche dopo il trapianto, in particolare il tumore basale rappresentato (Fig. 3C) mostra un *pattern* d'espressione ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER-2<sup>+</sup>, CK5<sup>+</sup>, Ck8-18<sup>-</sup> e Ki67<sup>+</sup> che coincide con quello del tumore parentale.



**Figura 3. Potenziale tumorigenico delle CST di mammella *in vivo***

(A) Cinetica della crescita tumorale di cellule staminali tumorali (CST) e cellule differenziate derivate da carcinoma (luminale e basale) umano alla mammella e iniettate ortotopicamente in 2 gruppi di 3 topi NOD/SCID a diluizioni seriali ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  cellule). Le curve rappresentate derivano da una media delle misurazioni tumorali effettuate settimanalmente nei due fenotipi.

(B) Immagine rappresentativa di un inoculo ortotopico di mammosfere tumorali su di un fianco e cellule differenziate di mammella sull'altro fianco, in topi NOD/SCID.

(C) Colorazione E&E e analisi immunoistochimica di ER, PR, c-ERB, Ki67 e ALDH rivelata mediante AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di *xenograft* derivati da sfere di carcinomi basali alla mammella. I nuclei sono stati rivelati mediante colorazione con ematossilina (blu).

E' mostrato uno di tre indipendenti esperimenti.

## IL4DM induce al differenziamento e sensibilizza alle terapie convenzionali

Per studiare *in vivo* l'effetto sulla morte cellulare indotta dal chemioterapico nelle mammosfere tumorali dopo inibizione del segnale di IL4, sono stati inoculati

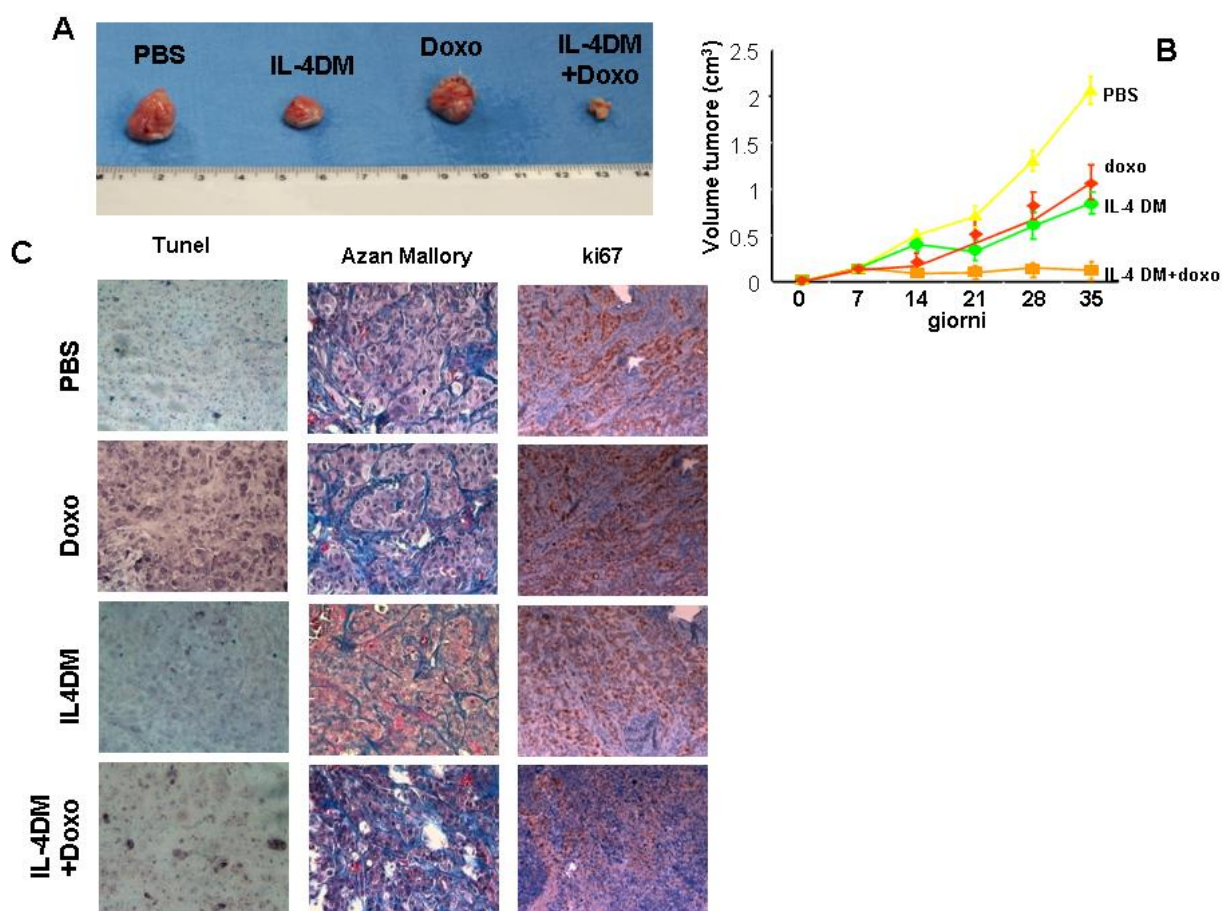
ortotopicamente topi NOD/SCID con mammosfere isolate da tumori basali e luminali. Dopo rilevazione di un tumore di 0,25 cm<sup>3</sup> i topi sono stati trattati (intraperitonealmente) con IL-4DM, doxorubicina singolarmente ed in combinazione; i controlli sono stati valutati utilizzando PBS (Fig. 4A).

L'analisi della cinetica della crescita tumorale nei suddetti topi ha evidenziato un marginale rallentamento (ritardo) della velocità di crescita (circa 3 settimane rispetto al controllo) nei tumori trattati con IL-4DM e doxorubicina. Tuttavia un decremento più significativo della crescita tumorale è evidente nel doppio trattamento IL-4DM più doxorubicina.

In entrambi i fenotipi tumorali tuttavia è stato evidenziato un andamento analogo, pertanto è stata eseguita una media delle misurazioni tumorali effettuate settimanalmente nei due fenotipi (Fig. 4B).

L'effetto dell'IL-4DM sulla morte cellulare nei tumori è stato valutato anche *ex vivo* mediante analisi d'immunoistochimica per Ki67, TUNEL e Azan Mallory su sezioni di *xenograft* ottenute dai suddetti topi trattati con IL-4DM, doxorubicina, IL-4DM più doxorubicina e PBS (Fig. 4C).

In regioni tumorali (Ki67<sup>+</sup>) dello *xenograft*, la TUNEL e l'Azan Mallory hanno evidenziato rispettivamente un elevato numero di cellule apoptotiche e un'elevata fibrosi associata a necrosi nei tumori co-trattati con IL-4DM più doxorubicina al contrario dei singoli trattamenti in cui si evidenziano modesti effetti sulla morte sia per apoptosi che per necrosi nei relativi tumori, rispetto al controllo. In conclusione gli esperimenti *in vivo* validano i risultati della sperimentazione *in vitro* sull'azione sensibilizzante dell'IL4DM sulla morte cellulare indotta dal chemioterapico, con un effetto sinergico in combinazione al chemioterapico.



**Figura 4. IL4DM promuove *in vivo* la sensibilizzazione alla morte cellulare indotta dal chemioterapico.**

(A) Rappresentativo set di *xenograft* derivati da mammosfere (isolati da tumori basali) inoculate ortotopicamente in topi NOD/SCID che sono stati trattati (intraperitonealmente) con IL-4DM, doxorubicina singolarmente ed in combinazione; I controlli sono stati valutati utilizzando PBS.

(B) Analisi della cinetica della crescita tumorale degli *xenograft* trattati come mostrato in Fig. 4A. Le curve rappresentate derivano da una media delle misurazioni tumorali effettuate settimanalmente nei due fenotipi.

(C) Tunel (colore nero-blu), Azan-Mallory e analisi d'immunoistochimica per Ki67 rivelato attraverso AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di *xenograft* di Fig. 4A. E' mostrato uno di tre indipendenti esperimenti.

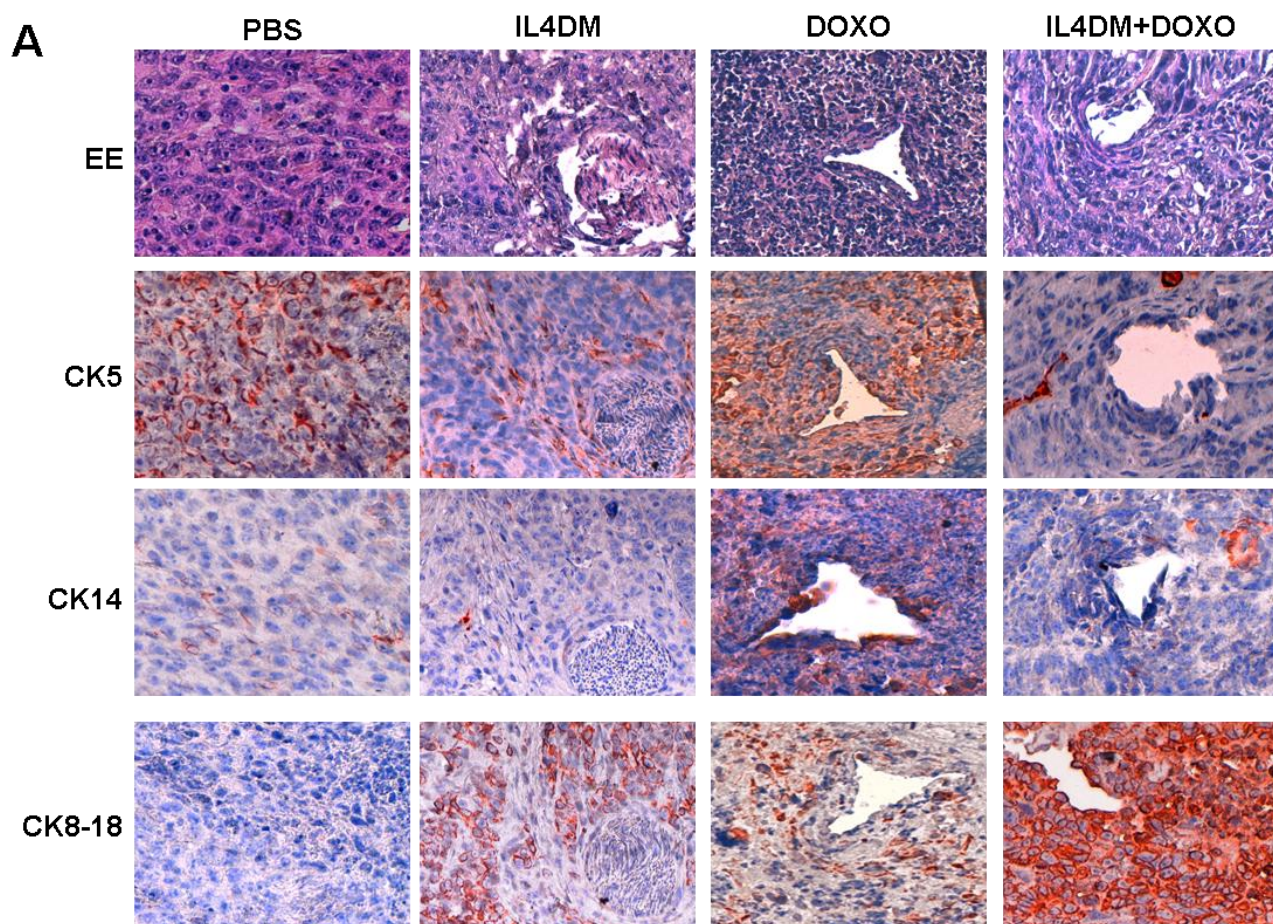
Al fine di studiare i meccanismi coinvolti nella chemiosensibilizzazione indotta da IL4DM, sono state saggiate mediante immunoistochimica le CK su sezioni di *xenograft* dei topi trattati con IL-4DM, doxorubicina, IL-4DM più doxorubicina e PBS.

I suddetti esperimenti, così come quelli successivi nel corso del lavoro, sono stati condotti sui tumori sia luminali che basali ma i dati rappresentati fanno riferimento solo ai basali su cui è stata focalizzata l'attenzione poiché un sottotipo più aggressivo e chemioresistente quindi più importante dal punto di vista clinico.

I tumori controllo hanno mostrato elevata positività solo per la CK5 in accordo con il fenotipo basale del tumore primario; gli *xenograft* trattati con IL4DM sono risultati altamente positivi per la citocheratina CK8/18 e al contrario hanno mostrato scarsa positività per CK5-14. Un *pattern* di espressione simile, seppur con livelli di espressione più marcati è stato evidenziato nello *xenograft* trattato con IL-4DM e doxorubicina. Il singolo trattamento con doxorubicina ha invece evidenziato positività per la CK5 e CK14 invece scarsi livelli della CK8/18 (Fig. 5A).

Questi dati suggeriscono che nei carcinomi mammari IL4DM induca il differenziamento delle cellule staminali tumorali che così potrebbero andare incontro a morte indotta dagli attuali trattamenti chemioterapici. In conclusione questi risultati suggeriscono un effetto differenziativo indotto dall'IL4DM sulle CST di mammella.





**Figura 5. IL4DM *in vivo* sensibilizza al chemioterapico mediante un processo differenziativo.**

(A) colorazione E&E e analisi immunoistochimica di CK5, CK14 e CK8-18 rivelata mediante AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di *xenograft* di Fig. 4A. I nuclei sono stati rivelati mediante colorazione con ematossilina (blu).

E' mostrato uno di tre indipendenti esperimenti.

## **BMP4 ipoteticamente media il processo differenziativo attuato dall' IL4DM *in vivo***

Recenti dati in letteratura condotti sul glioblastoma e tumori colon-rettali hanno evidenziato che membri della famiglia delle BMP tra cui BMP4 inibisce la formazione di sfere ed induce il differenziamento delle cellule CD133<sup>+</sup>.

Ci si è proposto di indagare se BMP4 potesse indurre differenziamento delle CST di mammella e contestualmente agire da mediatore nel differenziamento indotto dall'IL4DM.

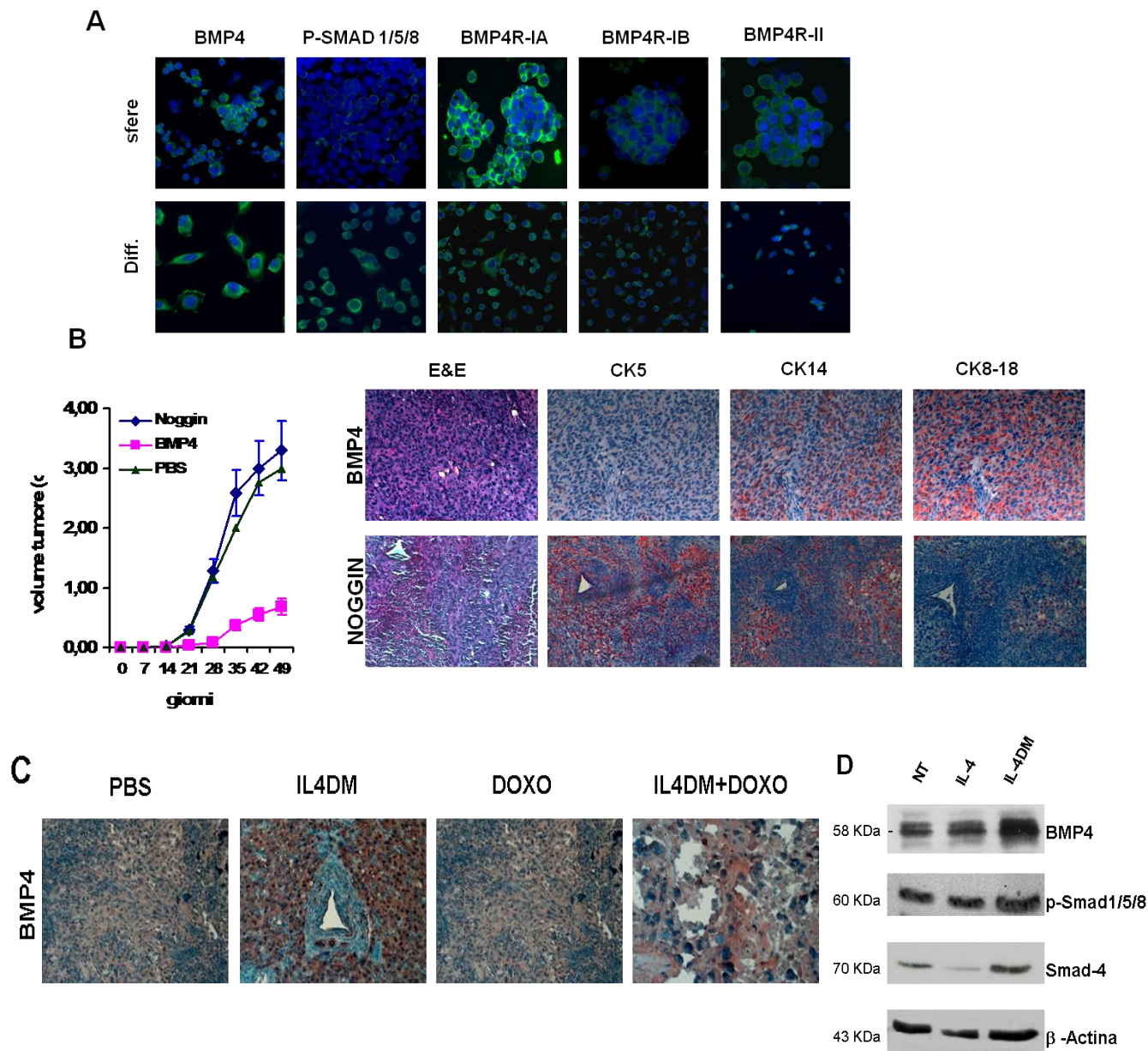
Per giungere a tale scopo è stato verificato che il segnale di BMP4 fosse attivo nel nostro sistema cellulare (sia CST che cellule differenziate) mediante un'indagine di immunofluorescenza per BMP4, i suoi recettori BMPRIA, BMPRIB, BMPRII così come di altre proteine che intervengono più a valle nella via del segnale quali le fosfoSmad1-5-8 (p-Smad 1-5-8). Le CST hanno mostrato positività per BMP4, negatività per BMPR1B così come per BMPRII a differenza del BMPRIA altamente espresso (Fig. 6A); tali risultati sono coerenti con la letteratura secondo cui nelle cellule staminali mesenchimali BMPR1B induce il differenziamento degli osteoblasti al contrario di BMPR1A che lo inibisce. Le p-Smad1-5-8, coinvolte nella traslocazione nucleare per l'attivazione dei geni *target* quando il *pathway* di BMP4 è attivato, risultano anch'esse negative. Le cellule differenziate dalle stesse CST hanno invece evidenziato un *pattern* di espressione opposto alle sfere.

Il canonico *pathway* di BMP risulta quindi inattivo nelle CST di mammella.

Per verificare se BMP4 potesse indurre differenziamento nel nostro sistema cellulare sono state trattate sfere di mammella con biglie di eparina-acrilico saturate separatamente con BMP4 e NOGGIN (co-trattamento) e poi iniettate ortotopicamente in topi immunocompromessi. Il controllo è stato valutato utilizzando PBS.

Sono stati rilevati tumori palpabili dopo circa 3 settimane, tuttavia la velocità di crescita tumorale era considerevolmente maggiore in quelli trattati con NOGGIN rispetto a quelli trattati con BMP4 (Fig. 6B, sinistra).





**Figura 6. Pathway di BMP4 in mammella**

(A) Analisi a microscopia confocale di BMP4, P-Smad 1-5-8, BMPRIA, BMPRIB, BMPRII (colore verde) su mammosfere tumorali e primarie. I nuclei (colore blu) sono stati contrastati mediante Toto-3 (colore blu).

(B) Colorazione E&E e analisi immunoistochimica di CK5, CK14, CK8-18 rivelata mediante AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di *xenograft* derivati da mammosfere incubate *in vitro* con biglie di eparina-acrilico saturate separatamente con BMP4 e NOGGIN (co-trattamento) ed inoculate ortotopicamente in topi NOD/SCID. I Nuclei sono stati rivelati mediante colorazione con ematossilina (blu).

Analisi della cinetica della crescita tumorale degli *xenograft* descritti sopra (pannello di sinistra).

(C) Colorazione E&E e analisi immunoistochimica di BMP4 rivelata mediante AEC (colorazione rossa) su sezioni paraffinate di *xenograft* di Fig. 4A. Nuclei sono stati rivelati mediante colorazione con ematossilina (blu).

(D) Analisi d'immunoblotting di BMP4, p-Smad 1-5-8 e Smad-4 in mammosfere non trattate (nt) (usate come controllo) e trattate con IL4DM o IL4 per 48h. La normalizzazione è stata realizzata mediante  $\beta$ -Actina.

L'effetto differenziativo di BMP4 è stato confermato dall'analisi delle CK: *xenograft* generati dal trattamento di BMP4 mostrano negatività per CK5, una moderata positività per CK14 e alti livelli d'espressione di CK8-18 nonché un fenotipo luminale; al contrario le mammosfere trattate con NOGGIN hanno originato un tumore CK5<sup>+</sup>, moderata espressione di CK14 e una riduzione dei livelli di espressione della CK8-18 quindi un *pattern* di espressione più somigliante al fenotipo basale (Fig. 6B, destra).

Questi risultati suggeriscono che BMP4 potrebbe spingere il differenziamento delle CST di mammella riducendone il potenziale tumorigenico, pertanto potrebbe essere impiegato nell'ambito di nuove terapie anticancro contro le CST.

Al fine di valutare l'eventuale *cross-talk* tra il *pathway* attivato da BMP4 e IL4, è stata condotta un'analisi immunohistochimica per BMP4 sugli *xenograft* ottenuti da topi trattati con IL-4DM, doxorubicina, IL-4DM più doxorubicina e PBS. I livelli di BMP4 sono risultati overespressi in tumori appartenenti a topi trattati con IL-4DM, invece scarsamente espressa nei tumori doppiamente trattati e assente negli *xenograft* di topi trattati con doxorubicina e PBS (Fig. 6C). Questi risultati supportano l'ipotesi che IL4DM potrebbe indurre l'overespressione di BMP4 che potrebbe agire da mediatore nel processo di differenziamento osservato nelle CST.

Per supportare ulteriormente questi risultati è stata condotta un'indagine western blot che ha evidenziato un significativo incremento dei livelli proteici di BMP4, così come di molecole che intervengono più a valle nella via del segnale quali p-SMAD1-5-8 e SMAD4, in mammosfere esposte a IL4DM (per 48h) al contrario delle sfere non trattate (usate come controllo) e trattate con IL4 (Fig. 6D).

In conclusione gli esperimenti *in vitro* sono coerenti con quelli *in vivo* ed evidenziano come l'inibizione del *pathway* dell'IL4 induca differenziamento mediato da BMP4.

## **L'IL4 in CST di mammella agisce da fattore di sopravvivenza e contribuisce al mantenimento della staminalità**

Lo studio del *pathway* attivato dall'IL4 nelle CST di mammella è stato condotto mediante indagini di proteomica attraverso la teoria dell'RPPM (*Reverse Phase Protein Microarray*) condotta presso il gruppo di ricerca del Prof. Liotta. Il microarray proteico é una nuova tecnologia designata a misurare con alta specificità e resa i livelli proteici; la correlazione tra espressione genica e proprietà tumorali fornisce l'identificazione di molecole con valore prognostico e contestualmente apre la strada verso trattamenti antitumorali di nuova generazione.

L'analisi condotta dopo 15, 60, 90 minuti dalla somministrazione della citochina, ha consentito di ottenere un profilo della cinetica di attivazione della proteina.

Dopo 15 minuti di trattamento si evidenzia attivazione del *pathway* dell'IL4 IRS e STAT6 dipendente. In accordo dopo 90 minuti aumentano in maniera significativa i livelli di fosforilazione di AKT, GSK3 $\beta$  ed mTor.

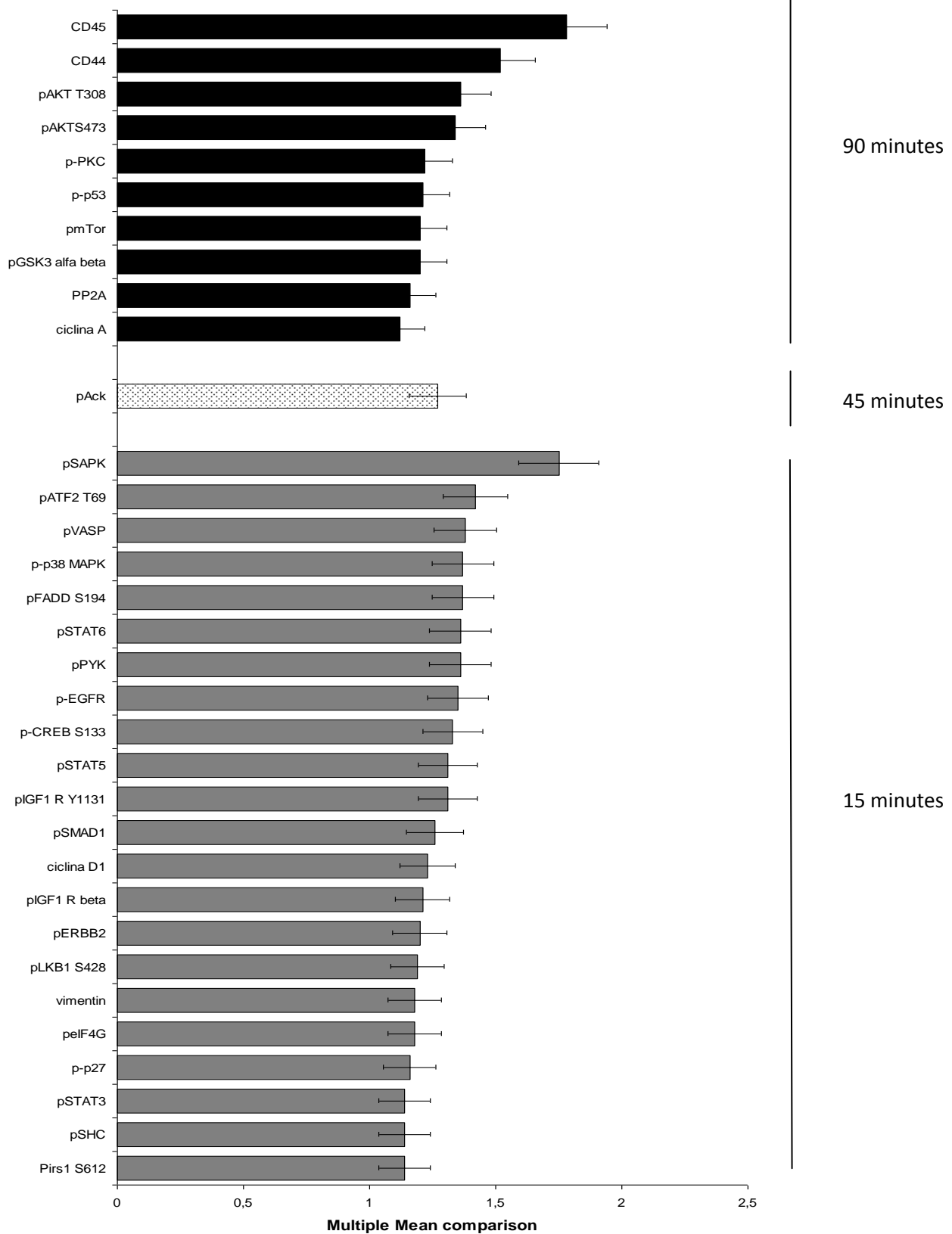
Globalmente L'IL4 attiva *pathway* di proliferazione come evidenziato dall'upregolazione tempo-dipendente delle cicline: dopo 15 minuti si attiva la ciclica D1 e dopo 90 minuti la ciclica A.

Nelle CST stimulate con IL4 è stata osservata upregolazione di altre molecole coinvolte nella proliferazione: dopo 15 minuti di trattamento è stata evidenziata attivazione (fosforilazione) delle MAPK, P38 e SAPK, e come atteso anche un incremento dei livelli di fosforilazione di CREB/ATF2, che intervengono più a valle nella via del segnale.

I risultati ottenuti mediante RPPM rivelano inoltre un'overespressione di marcatori di staminalità (CD44) e mesenchimali (Vimentina).

Di notevole importanza è anche l'overespressione di pAck (attiva cdc 42) che aumenta la tumorigenicità e correla con l'invasività.

In conclusione nelle CST l'IL4 potrebbe agire da fattore di sopravvivenza inoltre potrebbe contribuire al mantenimento della staminalità e contestualmente all'inibizione del differenziamento.



**Figura 7. Analisi comparativa di proteine mediante RPPM.**

# Discussione

L'alta percentuale di mortalità dovuta al carcinoma mammario deriva dall'incapacità degli attuali trattamenti di contrastare lo sviluppo tumorale ed il processo metastatico.

Gli attuali protocolli clinici sono infatti più attivamente diretti contro la popolazione di cellule differenziate, generando significativa riduzione della massa tumorale ed un apparente successo del trattamento. Tuttavia molte evidenze sperimentali indicano che i convenzionali trattamenti anticancro sono inefficaci contro la sottopopolazione delle TIC/CST che mostrano caratteristiche di cellule staminali e a cui è associato il potenziale tumorigenico; ne segue un fallimento della remissione clinica a lungo termine e comparsa di recidive.

Maggiori evidenze pertanto suggeriscono che nuove terapie curative efficaci contro il cancro dovrebbero colpire selettivamente la popolazione delle CST.

Molecole che inducono differenziamento potrebbero rappresentare un promettente approccio per ostacolare la capacità autorinnovante delle CST ed eradicare la popolazione cellulare capace di guidare la crescita tumorale.

Questo studio è stato basato sull'uso dell'IL4DM che attraverso BMP4 attiverebbe un programma differenziativo nelle CST di mammella.

L'IL4DM nel cancro colon-rettale umano induce nelle CST una *down-regulation* di proteine antiapoptotiche (cFLIP, Bcl-xL e PED) sensibilizzandole alla morte cellulare indotta dal chemioterapico (FOLFOX).

L'attività pro-differenziativa di BMP4 è stata anch'essa proposta come nuova terapia anticancro nel glioblastoma [66] e cancro colon rettale [65].

I dati mostrati in questo studio dimostrano che le CST di mammella overesprimono autocrinamente IL4 che in seguito all'attivazione del relativo *pathway*, agisce da fattore di sopravvivenza delle CST rendendole chemioresistenti. Tuttavia, l'inibizione del segnale di IL4 nelle mammosfere tumorali mediante IL4DM sensibilizza maggiormente alla morte indotta dai chemioterapici attraverso una *dowregulation* di fattori antiapoptotici (BCL2) ed induzione del differenziamento terminale con uno *switch* del fenotipo da basale (CK5<sup>+</sup>) verso uno luminale più differenziato (CK8-18<sup>+</sup>).

Gli effetti pro-differenziativi mediati dalla neutralizzazione del *pathway* dell'IL4 sarebbero mediati da BMP4 la cui espressione è limitata alla progenie differenziata di tumori alla mammella al contrario è assente nella frazione di CST, che esprimono soltanto i recettori BMPRIA.

Il trattamento delle CST di mammella con IL4DM attiva il canonico *pathway* delle SMAD mediato da BMP4, la quale esercita un rapido effetto pro-differenziativo che previene l'espansione delle CST e contestualmente la loro deplezione rallentando lo sviluppo del tumore. Al contrario, con la somministrazione di Noggin si osserva una maggiore velocità di crescita tumorale.

Dati bibliografici mostrano come la terapia differenziativa rappresenti un'alternativa promettente di successo nella cura del cancro: ad esempio l'uso combinato di acido retinoico con chemioterapici per il trattamento della AML.

Sebbene l'applicazione clinica del trattamento combinato, IL4DM e Doxorubicina, richiede ancora un'ottimizzazione dei tempi di somministrazione e dei protocolli di trattamento, la soddisfacente risposta terapeutica ottenuta in *xenograft* murini supporta l'uso della terapia differenziativa che ha come *target* le CST nel cancro alla mammella.

In conclusione, questo studio ha fornito un possibile impiego di agenti differenziativi in combinazione con chemioterapici per il trattamento del cancro alla mammella. IL4DM induce differenziamento, soppressione della crescita e chemiosensibilizzazione delle CST di mammella mediante attivazione del *pathway* di BMP4.

Gli effetti terapeutici osservati dalla combinazione dell'IL4DM con chemioterapici hanno ulteriormente supportato la necessità di colpire la popolazione *stem-like* dei tumori per un miglioramento dei canonici trattamenti antineoplastici.



# **Materiali e metodi**

## **Purificazione di cellule tumorali e propagazione**

I campioni di carcinoma umano alla mammella, sono stati ottenuti da 4 pazienti (età compresa tra 30-80 anni) sottoposti a resezione chirurgica, in accordo con gli *standard* etici del comitato istituzionale. La diagnosi istologica si è basata su caratteristiche morfologiche microscopiche delle cellule tumorali determinandone il tipo istologico e il grado.

I campioni chirurgici sono stati dissociati enzimaticamente con collagenasi (1.5 mg/ml) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) e ialuronidasi (20 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) per 1 h . Dopo la digestione, il pellet è stato diviso in due parti, una parte mantenuto in Ham's/F-12 medium (Euroclone Ltd., West York, UK) supplementato con 5% siero fetale bovino (FBS), insulina (5µg/ml) e idrocortisone (1µg/ml), la restante parte è stata mantenuta invece in condizioni di non aderenza in Stem Cell Medium con fattori di crescita (EGF ed b-FGF). Queste ultime condizioni di coltura hanno permesso la selezione e propagazione di mammosfere tumorali, contenenti SC/progenitori tumorali, invece le cellule differenziate sono state selezionate negativamente. Le cellule formanti sfere sono state espanse mediante dissociazione meccanica seguita da ripiastramento delle singole cellule e dei piccoli aggregati cellulari in terreno fresco completo. Tutte le linee cellulari (in condizioni di adesione e non) sono cresciute a 37°C in un'atmosfera saturata col 5% di CO<sub>2</sub>.

## **Analisi western blot**

CST di mammella sono state trattate con IL4DM (7,5 µg/ml ), dopo 24h è stato aggiunto al terreno di coltura il chemioterapico, doxorubicina (1µM) o taxolo (100nM). 48h dopo il trattamento chemioterapico sono stati raccolti i pellet.

Inoltre mammosfere tumorali sono state trattate con IL4 (20 ng/ml ) e IL4DM (7,5 µg/ml ), 48h dopo il trattamento sono stati recuperati i pellet.

In tutte le indagini western blot, CST non trattate (NT) sono state utilizzate come controllo.

Le cellule sono state lisate in un buffer contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1mM PMSF, 1µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina, 1µg/ml aprotinina, 0,5M NaF and 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Per l'analisi Western, sono stati caricati 30 µg di proteine totali per *lane* prima dell'SDS-PAGE. Il trasferimento è stato eseguito su membrana di nitrocellulosa, I livelli di espressione proteica sono stati indagati usando anticorpi monoclonali mouse anti-BMP4 (Novocastra, clone 3H2 NCL-BMP4); anticorpi policlonali rabbit anti-pSmad1(Ser463/465)-Smad5(Ser463/465)-Smad8 (Ser426/428) (Cell Signaling Technology, cat n° 9511), anti-Smad4 (Cell Signaling Technology, cat n° 9515) e Anti-Bcl2 clone100 (Upstate cell signalling solutions, cat n° 05-729). La normalizzazione è stata effettuata mediante l'analisi di β-Actina utilizzando un anticorpo monoclonale (JLA20) mouse anti-Actina (Calbiochem cat # cp01).

## **Immunoistochimica, Immunofluorescenza e TUNEL**

L'Analisi d'immunoistochimica è stata effettuata su sezioni in paraffina (5 mm) di campioni di carcinoma alla mammella e xenotrapianti in topi NOD/SCID derivati da cellule staminali di cancro mammario umano.

Le sezioni sono state deparaffinate in xilene e reidratate in una scala discendente di etanolo (100% -50%) e successivamente un breve passaggio in acqua distillata. I vetrini sono stati riscaldati per lo smascheramento dei siti antigenici in 10 mM di sodio citrato (pH 6,0 o 9,9).

Dopo lavaggio in dH<sub>2</sub>O, l'inibizione della perossidasi endogena è stata effettuata con il 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAKO codice 004.400) 5 min.

Dopo due lavaggi in TBS, le sezioni sono state incubate con 10% di siero umano di donatori AB per 20 minuti, per bloccare la colorazione aspecifica. A seguito dell'eliminazione del siero in eccesso, le sezioni sono state successivamente esposte ad anticorpi specifici monoclonali mouse anti-CK5 (Novocastra, clone XM26 code NCL-L-CK5), anti-CK14 (Novocastra, clone LL002 cod NCL-L-LL002), anti-CK8/18 (Novocastra, clone CD10 cod. NCL-CK18), anti-ALDH (BD biosciences clone 44 cat n° 611194), anti-BMP4 (Novocastra, clone 3H2 cod. NCL-BMP4), anti-ER (Novocastra, clone 6F11 cod. NCL-L-ER-6F11), anti-PR (Novocastra, clone 16 cod. NCL-L-PGR-312), anti-c-ERB-B2 (Novocastra, clone CB11 code NCL-L-CB11), anti-Ki67 (DakoCytomation, clone MIB-1 cod. n. M7240), per un'incubazione O.N. a 4°C.

Le sezioni sono state lavate in PBS e incubate con immunoglobuline biotinilate anti-rabbit per 30 minuti a temperatura ambiente e trattate con streptavidina-perossidasi (LSAB2 sistema HRP-Kit, codice K0675 Dako). Gli *staining* sono stati rivelati usando il substrato 3-amino-9-ethylcarbanzole (AEC substrato cromogeno, Dako code K3464) ed ematossilina per contrastare i nuclei.

L'immunofluorescenza è stata eseguita su CST di tumore (basale e luminale) alla mammella e sulla loro progenie differenziata ottenuta dalla loro dissociazione seguita dalla piastratura in coltura in presenza di 5% FBS (per 1-3-5 giorni). Le cellule sono state fissate

con paraformaldeide 2% per 30 minuti a 37°C poi lavate due volte in PBS e incubate in PBS-Tritonx-100 freddo per 10 minuti eccetto che per le proteine transmembrana. Dopo due lavaggi in PBS, le *slide* sono state incubate in BSA 5% (USBIOLOGICAL, code c8020769) per 30 minuti e successivamente esposti ad anticorpo primario specifico monoclonale mouse anti-CK5 (Novocastra, clone XM26 code NCL-L-CK5) anti-CK14 (Novocastra, clone LL002 cod. NCL-L-LL002) anti-CK8/18 (Novocastra, clone CD10 cod. NCL-CK18) anti-ALDH (BD biosciences clone 44 cat n° 611194) anti-IL4 ( R&D systems, clone 3007.11 cat n° MAB304), anti-IL4R ( R&D systems, clone 25463.111 cat n° MAB230), anti-IL13 R $\alpha$ 2 ( R&D systems, cat n° AF146), anti-BMP4 (Novocastra, clone 3H2 cod. NCL-BMP4), anti-BMP4 RIA ( R&D systems, clone 87933 cat n° MAB2406), anti-BMP4 RIB/ALK-6 ( R&D systems, clone 88614 cat n° MAB505), antiHuman-CD44 (Ansell corporation, clone: BU75, isotipo: mouse IgG2a,k cat n° 352-020), antiHuman-CD24 (BD Biosciences, clone: ML5, isotype: mouse IgG2a, cat n° 352-020) policlonale rabbit anti-PhosphoSmad1(Ser463/465)-Smad5(Ser463/465)-Smad8 (Ser426/428) (Cell Signaling Technology, cat n° 9511), durante l'incubazione over night a 4°C. Dopo 2 lavaggi in PBS, le *slide* sono state incubate con anticorpo secondario FITCH-coniugato anti-mouse (Molecular Probes, Invitrogen, cod. A-11001) o un anticorpo anti-rabbit (Molecular Probes, Invitrogen, code A-11008) più RNasi (200ng/ml SIGMA). I nuclei sono stati contrastati usando Toto-3 (Molecular Probes, Invitrogen, code T3604) e l'analisi confocale è stata usata per acquisire immagini a fluorescenza.

L'Apoptosi è stata determinata mediante In Situ Cell Death Detection, AP Kit (Boehringer Mannheim code n.11684809910, Roche). La marcatura dei frammenti di DNA (reazione TUNEL) è stata eseguita su sezioni tumorali paraffinate di *xenograft* (10 mm). Le sezioni sono state deparaffinate in xilene e reidratate in una scala

discendente di etanolo (100% -50%) e successivamente un breve passaggio in acqua distillata.

Dopo un'incubazione di 5' in PBS 1X, le sezioni sono state permeabilizzate per 10' con PBS/TritonX 100. Dopo un breve lavaggio in PBS, è stata eseguita la marcatura dei frammenti di DNA mediante una mix costituita da buffer ed enzima Terminal Deoxynucleotidiltransferase (TdT diluiti 1:10), che catalizza la polimerizzazione di nucleotidi marcati con fluoresceina all'estremità libera 3'-OH del DNA (TUNEL-reazione), questa mix viene lasciata agire sulle sezioni per 1 ora a 37°C. La fluoresceina incorporata è stata rilevata mediante anticorpi anti-fluoresceina AP-converter, coniugato con fosfatasi alcalina (AP), per 30 'a 37 ° C.

I frammenti di DNA marcati sono stati rilevati attraverso il substrato 5-bromo-4-cloro-3-fosfato-indolil (BCIP/NBT colore blu scuro, VECTOR codice SK-5400). Il controllo positivo è stato eseguito pretrattando i campioni con la DNasi I (Qiagen, codice n.79254) diluita 1:50 per 10' a temperatura ambiente, mentre come controlli negativi sono stati usati gli stessi campioni senza TdT.

Per l'Azan Mallory le sezioni, dopo essere state deparaffinate e reidratate come descritto in precedenza, sono state colorate con azocarmine G più acido acetico 1% per 1 ora a 55 °C.

Dopo un breve lavaggio in dH<sub>2</sub>O le sezioni sono state colorate con miscela di Mallory (anilina blu, arancione G e acido ossalico) per 30 min. Le sezioni sono state disidratate in una scala crescente di etanolo (50% -100%), immerse in xilene e montate con resina sintetica.

## *Xenograft*

Topi NOD/SCID sono stati acquistati dalla Charles River Laboratories (Milano, Italia), ospitati in gruppi di 3-4 per gabbia e acclimatati alla struttura di stabulazione per un periodo minimo di 1 settimana prima di iniziare gli esperimenti.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati secondo le norme vigenti, osservando i principi interdisciplinari e le linee guida per l'uso di animali nella ricerca, *marketing* e formazione.

Mammosfere e cellule differenziate (10 giorni) di carcinoma (luminale e basale) umano alla mammella sono state iniettate ortotopicamente in 2 gruppi di 3 topi NOD/SCID a diluizioni seriali ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  cellule) nel volume finale di 50  $\mu$ l di una miscela 1:6 di Matrigel (BD, codice 354.230) e DMEM (Euroclone Ltd., West York, Regno Unito).

Inoltre 500.000 CST di cancro umano alla mammella, preparati come descritto in precedenza, sono stati iniettati ortotopicamente in 4 topi NOD/SCID;

Quando i 4 tumori hanno raggiunto le dimensioni di 0,25 cm<sup>3</sup>, i topi sono stati trattati i.p. con doxorubicina (2mg/kg ogni settimana al giorno 1 e 5 per 3 settimane) o IL-4DM (APOGENIX; 3 mg/kg ogni giorno per 3 settimane) da sola o in combinazione nel tumore. I controlli sono stati valutati utilizzando PBS.

Infine il co-trattamento è stato eseguito incubando, lo stesso giorno del trapianto, CST di mammella (500.000) con 100 biglie di eparina-acrilico (Sigma) saturate con BMP4 (500 ng) o NOGGIN (1500 ng) per 1h a 37°C; successivamente il mix di CST e biglie è stato inoculato ortotopicamente in topi NOD/SCID.

In ogni esperimento la cinetica della crescita tumorale è stata analizzata settimanalmente mediante l'utilizzo di un calibro e i volumi sono stati calcolati sulla base della formula:

$(\pi/6) \times \text{diametro maggiore} \times (\text{diametro minore})^2$ . Le curve rappresentate derivano da una media delle misurazioni tumorali effettuate settimanalmente nei due fenotipi.

## **Saggio di morte cellulare**

Sfere di mammella sono state pretrattate per 24h con IL4DM (7,5µg/ml) e poi poste in coltura con doxorubicina (1µM) o taxolo (100 nm) per 48h. Cellule trattate con PBS sono state usate come controllo. La vitalità cellulare è stata saggiata con il Kit cell Titer Aqueous (Promega Corporation, Madison, WI cat.G8080/1/2) seguendo le istruzioni del manuale.

In alternativa, la morte cellulare è stata valutata mediante colorazione arancio di acridina/etidio bromuro.

## **RPPM ( Reverse Phase Protein Microarray)**

Le indagini di proteomica mediante RPPE sono state condotte dal gruppo di ricerca del Prof. Liotta su CST stimulate con IL4DM (7,5µg/ml) a diversi tempi 15, 60, 90 minuti e 4 ore.

# **Bibliografia**

1. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
2. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
3. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
4. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6063-71.
5. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.
6. Stassi, G., et al., *Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6784-90.
7. Todaro, M., et al., *Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1491-9.
8. Vermeulen, L., et al., *Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13427-32.
9. Matsui, W., et al., *Characterization of clonogenic multiple myeloma cells*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2332-6.
10. Scopelliti, A., et al., *Therapeutic implications of Cancer Initiating Cells*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(8): p. 1005-16.
11. Dean, M., T. Fojo, and S. Bates, *Tumour stem cells and drug resistance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 275-84.
12. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
13. Ponti, D., et al., *Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5506-11.
14. Farnie, G. and R.B. Clarke, *Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling*. Stem Cell Rev, 2007. **3**(2): p. 169-75.
15. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
16. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
17. Galli, R., et al., *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7011-21.
18. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
19. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
20. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
21. Bapat, S.A., et al., *Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3025-9.



22. Fang, D., et al., *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9328-37.
23. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(5): p. R68.
24. Chute, J.P., et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11707-12.
25. Armstrong, L., et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1142-51.
26. Hess, D.A., et al., *Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1648-55.
27. Pearce, D.J., et al., *Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples*. Stem Cells, 2005. **23**(6): p. 752-60.
28. Lim, E., et al., *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 907-13.
29. Boecker, W. and H. Buerger, *Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept*. Cell Prolif, 2003. **36 Suppl 1**: p. 73-84.
30. Ahmed, N., et al., *Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(3): p. 268-78.
31. Monteiro, J. and R. Fodde, *Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives*. Eur J Cancer, 2010. **46**(7): p. 1198-203.
32. Hay, E.D. and A. Zuk, *Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(4): p. 678-90.
33. Perez-Pomares, J.M., et al., *Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs)*. Dev Biol, 2002. **247**(2): p. 307-26.
34. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
35. Savagner, P., *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition*. Bioessays, 2001. **23**(10): p. 912-23.
36. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
37. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, *Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?* Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
38. Blick, T., et al., *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 235-52.
39. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
40. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, *Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 873-87.
41. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, *Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors*. Trends Mol Med, 2008. **14**(5): p. 199-209.

42. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Mol Oncol, 2011. **5**(1): p. 5-23.
43. Cui, X., et al., *Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7721-35.
44. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
45. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
46. Loi, S., et al., *Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 239.
47. Agus, D.B., et al., *Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 127-37.
48. Menendez, J.A., I. Mehmi, and R. Lupu, *Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression*. J Clin Oncol, 2006. **24**(23): p. 3735-46.
49. Johnston, S., et al., *Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(33): p. 5538-46.
50. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.
51. Todaro, M., et al., *Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 389-402.
52. Mueller, M.T., et al., *Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 1102-13.
53. Kubo, M., et al., *Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6071-4.
54. Dontu, G., et al., *Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. R605-15.
55. Segev, D.L., C. Umbricht, and M.A. Zeiger, *Molecular pathogenesis of thyroid cancer*. Surg Oncol, 2003. **12**(2): p. 69-90.
56. Todaro, M., et al., *Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 7287-96.
57. Zeng, S., J. Chen, and H. Shen, *Controlling of bone morphogenetic protein signaling*. Cell Signal, 2010. **22**(6): p. 888-93.
58. Rider, C.C. and B. Mulloy, *Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists*. Biochem J, 2010. **429**(1): p. 1-12.
59. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
60. Ray, R.P., et al., *The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the Drosophila embryo*. Development, 1991. **113**(1): p. 35-54.
61. Jones, C.M., et al., *DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in Xenopus mesoderm induction*. Development, 1992. **115**(2): p. 639-47.
62. Zhang, H. and A. Bradley, *Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development*. Development, 1996. **122**(10): p. 2977-86.
63. Sneddon, J.B. and Z. Werb, *Location, location, location: the cancer stem cell niche*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 607-11.
64. Lee, J., et al., *Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 69-80.
65. Lombardo, Y., et al., *Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 297-309.

66. Piccirillo, S.G., et al., *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 761-5.
67. Beug, H., *Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy?* Cell, 2009. **138**(4): p. 623-5.
68. Liu, S., et al., [*Breast cancer pathogenesis of stagnation of phlegm, poison and blood stasis: rationale and clinical application in traditional Chinese medicine*]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2007. **5**(2): p. 122-5.
69. Kabos, P., et al., *Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers*. Breast Cancer Res Treat, 2010.
70. Mentink-Kane, M.M., et al., *IL-13 receptor alpha 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 586-90.
71. Zurawski, S.M., et al., *Definition and spatial location of mouse interleukin-2 residues that interact with its heterotrimeric receptor*. EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5113-9.